



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Fisiología Humana, Histología Humana,
Anatomía Patológica y Educación Física Deportiva

Tesis Doctoral

PROLIFERACIÓN CELULAR Y REGULACIÓN DE LA
TELOMERASA EN CÁNCER DE MAMA


João José Guegués Silva Dias

Málaga, 2017



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: João José Guegués Silva Dias

 <http://orcid.org/0000-0002-3189-0574>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



El Prof. Dr. Luis Vicioso Recio, Profesor Titular del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de Málaga, la Dra. Martina Álvarez Pérez, Profesora Asociada del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de Málaga y el Prof. Dr. Pedro Castelo-Branco, Profesor Titular del Departamento de Ciencias Biomédicas y Medicina de la Universidad del Algarve (Portugal).

CRETIFICAN

que João José Guegués Silva Dias ha realizado personalmente y bajo nuestra dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral titulada “Proliferación celular y regulación de la Telomerasa en cáncer de mama”

Revisado el presente trabajo, estimamos que puede ser presentado al tribunal que ha de juzgarlo, y autorizamos la presentación de esta Tesis Doctoral en la Universidad de Málaga.

En Málaga, enero de 2017

Prof. Dr. Luis Vicioso Recio
Profesor Titular del Dpto. de Anatomía Patológica
Universidad de Málaga

Dra. Martina Álvarez Pérez
Profesora Asociada del Dpto. de Anatomía Patológica
Universidad de Málaga

Prof. Dr. Pedro Castelo-Branco
Profesor Titular del Dpto. de Ciencias Biomédicas y Medicina
Universidad del Algarve

A Berta

A Tiago, David y Lara

A mis padres

La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones
y la fuente de todo el progreso.

Louis Pasteur (1822-1895)

AGRADECIMIENTOS

Muchas son las personas que han participado en este trabajo y a ellos quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a los directores de esta tesis doctoral: Prof. Dr. Luis Vicioso, Dra. Martina Álvarez y Prof. Dr. Pedro Castelo-Branco por la idea original de este estudio y confianza en mí para defenderla y por su inestimable ayuda en la elaboración de este trabajo y contribución a mi formación como investigador.

Gracias a los pacientes, de los que nace y a los que va destinado este trabajo, que con su consentimiento desinteresado nos permiten seguir investigando sus enfermedades.

Gracias a la Doctora Joana Apolonio, investigadora del Departamento de Ciencias Biomédicas y Medicina de la Universidad del Algarve (Portugal), por su trabajo en la realización de técnicas de extracción de ADN y análisis de la telomerasa.

Gracias a los Dirigentes del Hospital de Faro y muy en especial al Doctor José Luis Enriquez Morera, Director del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital de Faro en Algarve (Portugal) y al Doctor António Jesus Cadillá patólogo del mismo Departamento, por haber permitido el trabajo y la selección de los bloques de tejido mamario para este estudio.

Gracias a los revisores, evaluadores y miembros del Tribunal que han permitido discutir la tesis.

Gracias a todos aquellos que están cerca de mí, que me han prestado un gran apoyo moral y afectivo.

Gracias a mis hijos, Tiago, David y Lara, por perdonarme mis momentos de ausencia.

Gracias a mi mujer, Berta, por su comprensión y apoyo inestimable en este proyecto.

Gracias a mis padres, a quien debo mi educación. A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	8
A.	EPIDEMIOLOGIA	10
B.	FACTORES PRONÓSTICOS EN EL CARCINOMA DE MAMA	12
C.	PROLIFERACIÓN CELULAR Y CÁNCER DE MAMA.....	13
1.	METODOLOGÍA Y VALORACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN CÁNCER DE MAMA.....	14
2.	RELEVANCIA PRONOSTICA DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL CÁNCER DE MAMA.....	15
D.	TELÓMEROS Y TELOMERASA.....	17
1.	DESCRIPCIÓN DE LA TELOMERASA	19
2.	PAPEL BIOLÓGICO DE LA TELOMERASA	21
3.	TELOMERASA Y CÁNCER	25
4.	TELOMERASA EN EL CÁNCER DE MAMA	37
5.	TELOMERASA Y PROLIFERACIÓN CELULAR	39
II.	PLANTEAMIENTO DEL TEMA	44
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	46
IV.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	58
A.	ANÁLISIS DESCRIPTIVO	58
B.	ESTUDIO ANALÍTICO	72
C.	ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL.....	86
D.	ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD.....	100
V.	DISCUSIÓN.....	118
VI.	CONCLUSIONES.....	134
VII.	BIBLIOGRAFIA	135

• LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ALT	<i>Alternative Lengthening of Telomeres</i>
ARN	Ácido Ribonucleico
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
Her2	Receptor 2 de Factor de Crecimiento Epidérmico Humano
hTERC	<i>Telomerase RNA Component Human</i>
hTERT	<i>Telomerase Reverse Transcriptase Human</i>
IARC	<i>International Agency of Research on Cancer</i>
IHQ	Inmunohistoquímica
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OIS	<i>Oncogene-Induced Senescence</i>
PAM	<i>Prediction Analysis of Microarray</i>
PCNA	Antígeno Nuclear de Células en proliferación
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PHH3	Histona H3 Fosforilada
QT	Quimioterapia
RE	Receptores de Estrógenos
REDECAN	Red Española de Registros de Cáncer
RH	Receptores Hormonales
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RP	Receptores de Progesterona
RT	Radioterapia
SEER	<i>Surveillance Epidemiology and End Results</i>
SPSS	<i>Statistical Product and Service Solutions</i>
TEP1	<i>Telomerase Associated Protein 1</i>
TERC	<i>Telomerase RNA Component</i>
TERT	<i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
THOR	<i>TERT Hypermethylated Oncological Region</i>
TNM	<i>Tumor Node Metastasis Staging System</i>
TRAP	<i>Telomerase Repeat Amplification Protocol</i>

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama, el más común entre las mujeres, es una enfermedad heterogénea con una morfología, comportamiento evolutivo y respuesta terapéutica diversas. Tradicionalmente se ha utilizado la expresión de marcadores inmunohistoquímicos, incluyendo el receptor de estrógeno (RE), el receptor de progesterona (RP) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (Her2), junto con la información clínico-patológica para clasificar el cáncer de mama y predecir el desenlace de la enfermedad.^{1,2,3,4}

La integración de datos morfológicos y moleculares tiene el potencial de refinar la clasificación del cáncer de mama, predecir la respuesta a la terapia, aumentar la comprensión de la biología del cáncer de mama y mejorar el manejo clínico. Uno de los mayores avances recientes ha sido proporcionado por los estudios de expresión génica, que han revelado la existencia de diferentes subtipos moleculares intrínsecos del cáncer de mama, biológicamente y clínicamente distintos. De estos estudios hay que relevar los del grupo de Charles Perou que han establecido el PAM50, y que ha servido de base para determinar la clasificación de St. Gallen.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15}

De acuerdo con la clasificación de St. Gallen, los cánceres de mama se pueden clasificar de forma subrogada mediante inmunohistoquímica en cinco subtipos: Luminal A (RE alto / RP, Her2 negativo, Ki67 <20%, T1 / 2 y N0 / 1); Luminal B / Her2 negativo (RE bajo / RP, Her2 negativo, Ki-67 \geq 20%, N2 / 3, T3, grado histológico 3 e invasión linfovascular extensa); Luminal B / Her2 positivo (RH positivos y Her2 positivo); Her2 (RH negativo y Her2 positivo) y Triple negativo (RH negativo y Her2 negativo).

Aproximadamente el 75% de los cánceres de mama expresan genes típicos de células epiteliales lumbinales, con receptores hormonales (RH) positivos, bien sea el receptor de estrógeno (RE) y / o el receptor de progesterona (RP).

Los cánceres de mama Luminal A tienen un buen pronóstico. Los cánceres de mama Luminal B tienen una mayor tasa de recurrencia y una menor supervivencia en comparación con el subtipo Luminal A. Los tumores HER2+ se producen con una frecuencia del 10% y se caracterizan por una alta expresión del gen Her2 (RE- / RP- / Her2 +), que confiere comportamiento biológico y clínico agresivo. El cáncer de mama triple negativo es un tipo particular de cáncer de mama que comprende aproximadamente el 15% de todos los casos y se define por la falta de expresión de los genes RE, RP y Her2. La mayoría de los casos de tumores triple negativo (80%) también comparten características de los cánceres de mama de tipo basal por la expresión de marcadores basales, como CK5-6 o receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que se identifican mediante perfiles de expresión génica^{1,2,3,4}

Recientemente, ha habido una mayor conciencia de la influencia potencial de los factores ambientales en las características de agresividad del cáncer de mama. Un mecanismo por el cual estos procesos podrían ejercer sus efectos sobre la actividad de los genes del cáncer de mama es a través de alteraciones epigenéticas, incluyendo la metilación del ADN. Por lo tanto, la adición de la clasificación basada en la metilación del ADN y la expresión génica podría mejorar la predicción pronóstica y la respuesta terapéutica.¹⁶ El silenciamiento génico epigenético de los genes supresores de tumores a través de la hipermetilación del ADN promotor es una característica común en los cánceres humanos.¹⁷

El cáncer de mama es una enfermedad genética y los recientes avances en biología molecular han revelado alteraciones epigenéticas recurrentes que podrían contribuir a su mejor clasificación y tratamiento.

A. EPIDEMIOLOGIA

El cáncer de mama es el cáncer más común y representa el 25% de todos los casos de cáncer y el 15% de todas las muertes por cáncer entre las mujeres.¹⁸

Es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres de 20 a 59 años, aunque es reemplazado por cáncer de pulmón en mujeres de 60 años o más.¹⁹ Es aproximadamente 100 veces más común en mujeres que en hombres, aunque los hombres tienden a tener peores resultados de supervivencia debido a retrasos en el diagnóstico.

La incidencia varía mucho en todo el mundo, con tasas normalizadas por edad de hasta 99,4 por 100.000 en América del Norte. Europa oriental, América del Sur, África austral y Asia occidental presentan incidencias moderadas, pero en aumento. La incidencia más baja se da en la mayoría de los países africanos, pero aun en ellos hay incremento de la incidencia de cáncer de mama.²⁰

Las tasas de supervivencia del cáncer mamario también son variables, desde el 80% o más en América del Norte, Suecia y Japón, pasando por un 60% aproximadamente en los países de ingresos medios, hasta cifras inferiores al 40% en los países de ingresos bajos.

En el año 2008 se diagnosticaron aproximadamente 1.380.000 casos nuevos de cáncer de mama en el mundo. En la actualidad es el tumor más frecuente en la población femenina tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo.²⁰

La incidencia en España es menor que la de Estados Unidos y Canadá, Reino Unido, Países Bajos, Bélgica, Alemania, Francia y Suiza y similar al resto de los países de Europa Mediterránea, Centroeuropeos, Portugal e Irlanda.

En España se diagnostican unos 26.000 casos al año, lo que representa casi el 30% de todos los tumores del sexo femenino en nuestro país. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 80 años, con un máximo entre los 45 y los 65.²⁰ No obstante, no disponemos de un Sistema Nacional de Registro de Tumores para conocer las cifras exactas.

En España existe una distribución geográfica de incidencia notablemente variable según las provincias. Así en Cataluña la tasa de incidencia es de 83,9 casos /100.000 habitantes, mientras que la media nacional se sitúa en 50,9 casos / 100.000 habitantes.²¹

De acuerdo con la *American Cancer Society*, el aumento de la incidencia se estima en un 1-2% anual y es constante desde 1960 en Estados Unidos. Se estima que el riesgo de padecer cáncer de mama a lo largo de la vida es de, aproximadamente, 1 de cada 8 mujeres.²¹

Tanto el número de casos como las tasas de incidencia aumentan lentamente en España y en el mundo, probablemente debido al envejecimiento de la población y a un diagnóstico cada vez más precoz.

En Portugal, la incidencia del cáncer de mama es inferior a la media europea, aunque sigue siendo el cáncer más frecuente en la mujer, con tasas de mortalidad heterogéneas debido a diversos factores de tipo demográfico y socioeconómico, a las características biológicas de los tumores y el acceso a la atención médica.²²

B. FACTORES PRONÓSTICOS EN EL CARCINOMA DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad compleja y heterogénea que incluye tumores de pronóstico y respuesta clínica variable a los tratamientos. La clasificación estándar de los tumores de mama se ha basado en criterios morfológicos y anatómicos como el tamaño y extensión del tumor (estadaje TNM), características histopatológicas (grado tumoral) y expresión de marcadores tumorales como RE, RP y Her2. Aunque estos parámetros pueden correlacionarse bien con la supervivencia en algunos pacientes, su valor como factores pronósticos y predictivos es limitado.²³ Se necesitan más biomarcadores para la terapia y la predicción de los resultados porque los cánceres de mama humanos son diversos en su naturaleza genética y su respuesta a la terapia.²⁴ La identificación de biomarcadores moleculares con valor pronóstico sigue siendo una necesidad insatisfecha en el manejo actual del cáncer de mama.²⁵

En los últimos años, la administración de quimioterapia neoadyuvante se ha incrementado debido a que proporciona no sólo un aumento de la probabilidad de extirpación quirúrgica exitosa y mínimamente invasiva en un subgrupo de pacientes, sino que, además, estudios recientes también han demostrado que la evaluación anatomopatológica de la eficacia de la quimioterapia neoadyuvante, principalmente la

respuesta patológica completa o la carga residual de cáncer, se asocian significativamente con la mejora de la supervivencia libre y global de enfermedad.

En el contexto de adyuvancia las características clinicopatológicas son comúnmente complementadas con información genómica con el fin de adaptar las decisiones de tratamiento al paciente, lo que también es útil en el entorno neoadyuvante para decisiones similares.²⁶ La división en subtipos moleculares establecida por Perou y colaboradores a principios de este siglo es buena prueba de ello.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15}

C. PROLIFERACIÓN CELULAR Y CÁNCER DE MAMA

La proliferación es una característica distintiva del cáncer²⁷, una piedra angular de su progresión y por lo tanto un marcador tumoral importante.²⁸

Aunque el índice mitótico es la forma más establecida de evaluación de la proliferación, tiene limitaciones porque el número de mitosis por unidad de área no está linealmente relacionado con la tasa de proliferación.²⁹

Ha habido muchos métodos de cuantificar la proporción de células proliferantes. El recuento mitótico tradicional se utiliza todavía para clasificar el grado de agresividad de una variedad de tumores incluyendo el cáncer de mama. Además del recuento mitótico, se han desarrollado más recientemente marcadores inmunohistoquímicos de proliferación, incluyendo el antígeno Ki67, el cual se expresa en el ciclo celular completo, el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) que es marcador de la Fase S, y la histona H3 fosforilada (PHH3) que es marcador de la fase mitótica.³⁰ El

Ki67 es actualmente el biomarcador de proliferación de elección, con valor pronóstico y predictivo en el cáncer de mama.²⁹

1. METODOLOGÍA Y VALORACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN CÁNCER DE MAMA

El *International Ki67 Breast Cancer Working Group* recomienda el conteo de un mínimo de 500 células tumorales invasoras en al menos tres campos representativos, incluyendo las zonas de proliferación.^{29,31} Sin embargo, en los diversos estudios que se encuentran en la literatura sobre Ki67, el número de células tumorales en las que hay que realizar el conteo varía ampliamente, desde decenas de células en tissue-microarrays hasta 3.000 en muestras más amplias, con una clara tendencia hacia la evaluación de conjuntos más grandes de células tumorales. Estadísticamente, la evaluación de un gran número de células proporciona errores estándar más pequeños, y por lo tanto, estimaciones Ki67 más precisas, ya que la proliferación tumoral no suele expresarse de forma homogénea.²⁹ Las muestras de tumores presentan tanto heterogeneidad en sí mismas como con otras muestras. Así, los tumores altamente proliferativos heterogéneos pueden clasificarse como de baja proliferación debido a un efecto de muestreo.

Estos resultados sugirieron la necesidad de optimizar el número de células tumorales evaluadas en una muestra específica. Si la optimización pudiera ser estandarizada, la heterogeneidad dentro de la muestra podría ser explicada estadísticamente, y puede que esto contribuyera al esfuerzo de alcanzar un consenso internacional sobre la evaluación del Ki67.

La práctica general en la calificación Ki67 se basa en una metodología no dinámica o estática. Se determina un número predefinido de células tumorales y se determina la fracción de células Ki67 positivas. Sin embargo, existen propuestas interesantes de nuevas metodologías de evaluación de Ki67 de forma dinámica, estableciendo *cut-offs* dependientes de la heterogeneidad tumoral y del tipo biológico de tumor,²⁹ y basadas en contajes sobre *hot-spots*, lo que se justifica basándose en la suposición de que las regiones de aumento de la proliferación son biológicamente activas y presumiblemente relevantes para el pronóstico.³¹

La automatización del conteo de Ki67, en plataformas digitales, ha arrojado resultados variables. En el trabajo de Fasanella y cols, los autores describen la discrepancia en los resultados de Ki67 entre la evaluación automatizada y la evaluación humana, revelando valores más altos de Ki67 en estos últimos.²⁹ Mohammed y cols, sin embargo, comunican un excelente acuerdo entre el índice de Ki67 automatizado y visual. Como herramienta pronóstica ambos métodos fueron útiles, sin embargo, el método visual es superior.²⁹

2. RELEVANCIA PRONOSTICA DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL CÁNCER DE MAMA

Aunque los biomarcadores asociados al ciclo celular, como la ciclina D1, ciclina E y p21, han sido considerados factores pronósticos, el resultado del ciclo celular es la proliferación celular, y por lo tanto, el análisis inmunohistoquímico (IHQ) de Ki67 utilizando el anticuerpo MIB-1 (marcador de la expresión del gen MKI67) ha surgido

como el marcador de elección con valor pronóstico y predictivo del tratamiento en el cáncer de mama.²⁹

El Ki67 es una proteína nuclear no histona identificada por primera vez por Gerdes a principios de los años 80 en la Universidad de Kiel, Alemania. Se expresa en las células proliferantes y está ausente en las células quiescentes, por lo que es óptimo para la evaluación como un biomarcador de proliferación tumoral. La función del Ki67 sigue siendo imprecisa, aunque se piensa que está involucrado en la síntesis de ARN ribosomal.²⁹

El Ki67 ha demostrado ser de valor pronóstico y predictivo en el cáncer de mama. La actividad proliferativa de las células tumorales, estimada por Ki67, proporciona una fuerte información pronóstica y predictiva sobre la respuesta a la quimioterapia.^{32,33} Sin embargo, la desafortunada falta de consenso en cuanto a su uso, tanto en lo referente a las fases pre-analítica, analítica y post-analítica, dificulta su plena aceptación clínica. El tipo de tejido, el tiempo de isquemia fría y caliente, el medio de fijación y el tiempo de fijación, son ejemplos de variables pre-analíticas. La elección de anticuerpos, el método de puntuación o la estrategia de presentación de informes son ejemplos de variables analíticas y post-analíticas. También son ejemplos de variables post-analíticas, específicamente el número de células tumorales evaluadas y la selección de áreas dentro de una sección tumoral que se utilizará para la evaluación de Ki67.

Cada subtipo intrínseco de cáncer de mama tiene un patrón particular de recaídas en el tiempo, que cambian dependiendo del nivel de activación de la vía de proliferación evaluada por el Ki67. Estos hallazgos podrían tener implicaciones clínicas tanto en el diseño del ensayo de tratamiento adyuvante como en las recomendaciones relativas a la

vigilancia de los pacientes. El cáncer de mama Luminal A muestra un lento aumento del riesgo, alcanzando su máximo después de tres años y manteniéndose posteriormente estable. El subtipo Luminal B presenta la mayor parte de sus recaídas durante los primeros cinco años. Los tumores HER2 muestran un pico de recurrencia casi veinte meses después de la cirugía, con un riesgo mayor si $Ki67 \geq 14\%$. Sin embargo, un segundo pico se produce a los 72 meses, pero la magnitud del riesgo es mayor si $Ki67 \geq 14\%$. Los tumores triple negativos con baja tasa de proliferación muestran una curva de riesgo suave, pero con $Ki67 \geq 14\%$ muestran un pico pronunciado en casi 18 meses.³⁴

D. TELÓMEROS Y TELOMERASA

Los telómeros humanos son estructuras nucleoproteicas esenciales situadas en los extremos de los cromosomas, compuestas de varios centenares de repeticiones de la secuencia 5'-TTAGGG-3'^{35,36,37,38} asociados a proteínas.^{39,40,41} Debido a su forma especial de empaquetamiento, están implicados en el mantenimiento de la integridad del ADN funcional de los cromosomas, protegiéndolo del ataque de exonucleasas que producirían la pérdida de nucleótidos de los extremos de la molécula de ADN. Además, impiden que se produzcan fusiones espontáneas entre los extremos de los cromosomas. Por tanto, su función principal es proteger contra la degradación de los extremos de los cromosomas, contribuyendo así a la estabilidad del genoma.^{28,42}

El ADN telomérico de los mamíferos se encuentra asociado a un complejo de seis proteínas denominadas *shelterinas* (del inglés *shelter*, refugio), compuesto por TRF1, TRF2, TIN2, RAP1, TPP1 y POT1. La principal función de las *shelterinas* es la de proteger a los telómeros de las actividades degradativas que se desencadenan a modo de respuesta ante las roturas de cadena en el ADN bicatenario y la subsecuente aparición

de ADN expuesto de cadena sencilla.⁴³ Entre las funciones de las *shelterinas*, cabe mencionar las del reclutamiento de la telomerasa, la replicación de los telómeros, la cohesión entre las distintas *shelterinas* y la formación de estructuras terciarias de ADN que favorecen la estabilidad de los telómeros (el denominado *t-loop*).^{44,45,46,47,48}

La estructura y la integridad de los telómeros son fundamentales para la estabilidad del genoma, y la longitud de los telómeros se mantiene por la expresión de la enzima telomerasa.⁴⁹ Sin embargo, el acortamiento cromosómico es característico de las células normales, y es conocido como el problema de replicación final. La longitud telomérica en cada tipo celular de nuestros tejidos disminuye con el tiempo, constituyendo por tanto una aproximación bastante representativa de la edad biológica de nuestros tejidos y órganos.⁵⁰ Se ha postulado que los telómeros podrían funcionar a modo de “reloj biológico”, reflejando el historial de las divisiones que cada célula ha experimentado a lo largo de su existencia.⁸³

La función protectora de los telómeros fue descrita en el final de la década de los años 1930 de forma independiente y simultánea por los científicos Bárbara McClintock y Hermann Müller, gracias a observaciones realizadas en sus diferentes modelos genéticos de estudio (*Zea mays* y *Drosophila melanogaster*, respectivamente), en los que detectaron que los extremos de los cromosomas eran cruciales para asegurar una transmisión correcta y equitativa de la información genética a las células hijas durante el proceso de división celular. Los estudios posteriores de Hayflicky Harley⁵¹ demostraron que durante la división celular los telómeros se acortan progresivamente en ausencia de expresión de telomerasa hasta alcanzar una longitud críticamente corta que desencadenaba respuestas de parada del ciclo celular y senescencia.

La telomerasa es la enzima responsable de extender los extremos de los cromosomas en la síntesis de nuevo, y ocurre en las células germinales así como en la mayoría de los tumores malignos. Se expresa durante el desarrollo embrionario, restringiéndose en el adulto a determinados compartimentos celulares tales como las células madre adultas, los órganos hematopoyéticos y las células reproductoras,^{52,53,54} y silenciándose en la mayoría de los tejidos normales.⁵⁵

El mantenimiento de la longitud telomérica, en consecuencia, requiere un delicado equilibrio entre erosión y alargamiento, para evitar un acortamiento excesivo que daría lugar a la aparición de síntomas asociados al envejecimiento prematuro, o una actividad telomerasa aberrante que podría favorecer la inmortalidad de células malignas.

1. DESCRIPCIÓN DE LA TELOMERASA

La telomerasa es un complejo ribonucleoproteico con actividad enzimática de la transcriptasa inversa, que es responsable de agregar repeticiones teloméricas (TTAGGG) en los extremos 3' de los cromosomas, con lo que se invierte la pérdida de ADN de cada ronda de replicación.

Hay tres subunidades de telomerasa: la telomerasa humana RNA (TERC), la telomerasa humana asociada a la proteína (TEP1) y la telomerasa humana transcriptasa inversa (hTERT/TERT). TERC y TEP1 se expresan constitutivamente, por lo que la actividad enzimática de la telomerasa depende de la transcripción de hTERT.

TERT consiste en una subunidad de proteína catalítica llamada transcriptasa inversa de telomerasa, codificada por el gen hTERT en seres humanos, que está posicionada en el cromosoma 5p15.33. El gen hTERT consta de aproximadamente 37 kb en ADN genómico del que 33 kb constituyen secuencia intrónica. El 4 kb restante lleva 16 exones para hacer el transcripto de mRNA de hTERT. El componente de RNA esencial (TERC), es codificado por el gen hTERC encontrado en la región cromosómica 3q26; hTERC actúa como una plantilla cuya secuencia es complementaria a la repetición telomérica 50-dTTAGGG-30, para la síntesis de telómeros ADN, y también participa en la catálisis, localización y montaje de la holoenzima telomerasa.

Mientras que el hTERC se expresa constitutivamente en la mayoría de los tipos de tejidos, los niveles de expresión de hTERT son lo suficientemente bajos como para que la longitud de los telómeros no pueda mantenerse, lo que restringe la vida proliferativa en las células normales.

En general, la expresión de la telomerasa es un proceso controlado. Sin embargo, no todos los mecanismos de control han sido aclarados. Se ha demostrado que el hTERC puede expresarse en células independientemente de la actividad de la enzima telomerasa, mientras que el hTERT sólo se expresa en células con actividad telomerasa.

Estudios de reconstitución *in vitro* demostraron que los componentes de ARN (hTERC) y la transcriptasa inversa (hTERT) son suficientes para reconstituir la actividad de la telomerasa^{56,57} y se ha establecido que hTERT es el componente limitante de esta actividad.

La metilación del ADN, la metilación de las histonas y la acetilación de las histonas son regulaciones epigenéticas básicas implicadas en la expresión de hTERT. El ARN no codificante puede también servir como una forma de control epigenético de hTERT. Esta regulación epigenética basada en hTERT es importante para proporcionar un mecanismo para la reversibilidad del control de hTERT en varios estados biológicos.⁵⁸

Las modificaciones epigenéticas en las regiones teloméricas y subteloméricas junto a la influencia de ARN teloméricos no-codificantes también influyen de forma drástica en la longitud telomérica y en su organización en dominios de cromatina, generando un nivel adicional de control de la longitud y función teloméricas.^{37,59,60,61,62}

La actividad de la telomerasa es también controlada por mecanismos hormonodependientes, siendo que algunos estudios establecen una relación significativa entre la actividad de la telomerasa y la positividad de los receptores de estrógenos y de progesterona.⁶³

2. PAPEL BIOLÓGICO DE LA TELOMERASA

La telomerasa juega un papel importante en la protección de los telómeros de la erosión que resulta de la replicación del ADN y daño oxidativo. Además, la telomerasa tiene otras actividades adicionales, que incluyen la estimulación de la proliferación celular, la protección contra el daño oxidativo y la apoptosis, la modulación de la expresión génica global, la activación de células madre y la promoción tumoral.⁶⁴ La telomerasa se activa durante la respuesta inmune y la cicatrización de heridas y se reactiva en

aproximadamente el 85% de los tumores humanos.⁶⁴ Se cree que la regulación negativa en los tejidos humanos de los adultos reduce la probabilidad de desarrollo tumoral.

La actividad de la telomerasa es evidente en las células madre de varios compartimentos, mientras que se observa una actividad insignificante inmediatamente después de la diferenciación de las células madre. La reconstitución de la actividad telomerasa en células somáticas diferenciadas se encuentra limitada, principalmente debido a la represión transcripcional de la telomerasa transcriptasa inversa (TERT), el componente catalítico de la telomerasa.

En consecuencia a la salida del compartimento de células madre, los telómeros de las células somáticas se acortan tras la división celular y los telómeros críticamente cortos activan la vía de respuesta al daño del ADN, resultando en la detención del ciclo celular y la senescencia. En cada ciclo replicante los telómeros se acortan a causa del problema intrínseco de la replicación de los extremos de las secuencias de ADN lineales (fenómeno conocido en inglés como "*end replication problem*").⁶⁵ La sucesiva erosión de los telómeros en cada división celular, resulta en la pérdida de su capacidad para proteger los extremos de los cromosomas y en pérdida de material genético (en cada división celular se pierden 50-100 pares de bases de ADN telomérico).^{66,67}

La acción de la telomerasa solo se produce de manera natural en ciertas etapas de nuestra vida, en las que la división celular es muy acelerada, como puede ser en las primeras células originadas tras la fecundación o en determinadas células de un individuo adulto como son las células troncales, también conocidas como células madre.

Por cada división que se produzca, la longitud del telómero se hace más corta, si no existe actividad telomerasa que lo repare y le dé su tamaño original. Al alcanzar el telómero, una longitud lo suficientemente pequeña, esto es tomado por la célula como una señal que le induce a apoptosis o muerte celular, evitando así que ésta pueda dividirse indefinidamente. Esto fue puesto de manifiesto por Hayflick y Moorhead que describieron que los fibroblastos humanos normales tienen una capacidad de replicación limitada en cultivo.⁶⁸

Otros tipos de células, tales como células epiteliales, mioblastos, astrocitos y linfocitos, también presentan una capacidad limitada de proliferación.^{69,70,71}

Estudios recientes sugieren que podríamos revertir el proceso de senescencia incrementando de forma artificial la cantidad de telomerasa en nuestras células. Incluso se podrían revertir algunas atrofas de nuestros tejidos debidas a la vejez, induciendo la síntesis de telomerasa.

Investigadores del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) han desarrollado un tratamiento que actúa sobre los genes de tal modo que, aplicado una sola vez en animales adultos, consigue de manera segura alargar la vida media de los individuos. La terapia génica desarrollada por el CNIO para combatir el envejecimiento se ha probado en ratones adultos de uno y dos años, con un efecto rejuvenecedor sobre ellos.⁷²

Hipotéticamente, los tratamientos con telomerasa evitarían la muerte, tanto celular como del individuo, por lo que sería el fármaco que otorgaría la inmortalidad. Sin embargo,

una consecuencia indirecta de alterar los genes de la inmortalidad celular sería una mayor propensión al cáncer.

Al administrar telomerasa a seres pluricelulares complejos como los humanos o animales, las células con capacidad de dividirse indefinidamente, se encontrarían en un estado en el que la sucesiva adquisición de alteraciones genéticas podría más fácilmente conseguir su transformación maligna. Cuando se estimula la actividad telomerasa y se inactiva un gen supresor de tumores (el gen p16INK4a) se produce immortalización celular, lo cual constituye un importante paso hacia la formación de un tumor.^{73,74}

El carácter contrapuesto entre senescencia y cáncer se ha visto reflejado en algunas investigaciones. La senescencia inducida por oncogén (OIS) es un mecanismo crítico de supresión tumoral que restringe la progresión del cáncer en estadios premalignos, en parte causando disfunción de los telómeros. Actualmente, se desconoce si esta detención proliferante presenta una barrera estable y, por tanto, irreversible para la progresión del cáncer.⁷⁵

Patel y cols, demuestran que las células detenidas en OIS conservan el potencial para escapar de la senescencia por mecanismos que implican la reactivación de la expresión de hTERT.⁷⁵

La alteración en el TERT puede causar acortamiento del telómero, en enfermedades relacionadas con la edad tales como la fibrosis pulmonar idiopática, la disqueratosis congénita y la anemia aplásica.⁷⁶

3. TELOMERASA Y CÁNCER

El cáncer es una enfermedad compleja tanto en su desarrollo como en la forma en que se manifiesta de un individuo a otro; se caracteriza por ser el resultado de múltiples alteraciones genéticas, como la activación de muchos pro-oncogenes y la inactivación de muchos genes supresores de tumores,⁴¹ que confieren a las células transformadas una serie de características que las distinguen de las células no transformadas. Estas características incluyen: capacidad de crecimiento autónomo, evasión de apoptosis, insensibilidad a señales antiproliferativas, capacidad de invasión tisular, formación de metástasis, inducción y mantenimiento de la angiogénesis.⁷⁷ Además, las células malignas deben adquirir un potencial de replicación ilimitado (inmortalidad celular) para la formación de tumores avanzados en humanos.

La capacidad de mantener suficiente longitud de telómeros es esencial para la proliferación celular y la tumorigénesis, y por lo tanto los tumores que surgen de células somáticas normales escapan al destino de tener los telómeros cada vez más cortos aumentando los niveles de telomerasa. Ello permite que las células malignas mantengan su longitud de telómero justo por encima del umbral crítico para evitar la senescencia y la apoptosis y adquieran un potencial de replicación ilimitado. De hecho, células tumorales cultivadas en el laboratorio a las que se les quita la telomerasa mueren rápidamente debido a un agotamiento de sus telómeros. Sin embargo, la expresión ectópica de telomerasa en células humanas somáticas normales en cultivo, contribuye a la transformación maligna.^{78,79,80} No obstante el 10% de los cánceres utilizan un mecanismo alternativo de alargamiento del telómero denominado ALT.⁸¹ También

sigue siendo poco claro cómo las señales extracelulares regulan el alargamiento de la telomerasa de los telómeros.⁸²

El desgaste del telómero durante sucesivas divisiones celulares induce la inestabilidad cromosómica y contribuye significativamente a los reordenamientos genómicos que pueden dar lugar a la tumorigénesis.⁸³ Los telómeros disfuncionales, originados por el acortamiento crítico de los telómeros en las células somáticas normales durante las divisiones progresivas de las células, provocan respuestas de daño del ADN que desencadenan la senescencia celular. Las células que adquieren cambios oncogénicos evitan la senescencia y continúan dividiéndose (período de vida útil prolongado) hasta que múltiples telómeros críticamente acortados inician la crisis (un período de senescencia replicativa completa, fusiones de extremo a extremo de cromosomas y apoptosis extensa). El período de crisis produce una muerte celular extensa. Sin embargo, algunas células escapan de la crisis y mantienen las longitudes de telómeros estables, pero acortados, para el crecimiento continuo de las células, progresando eventualmente a un fenotipo maligno.⁸³

Se ha comunicado la existencia de acortamiento de los telómeros en carcinomas in situ e invasivos, incluyendo el cáncer de mama, y se ha asociado con la recurrencia de la enfermedad después de la resección quirúrgica.⁸⁴ Muchos de estos tumores activan la telomerasa para estabilizar los extremos teloméricos y lograr la capacidad de replicación ilimitada.⁸⁵

En experimentos con ratones deficientes en telomerasa, no hubo evidencia de inhibición de tumores en las primeras generaciones. En generaciones tardías, los ratones deficientes en telomerasa muestran un moderado aumento en la incidencia de tumores

espontáneos caracterizados por alta tasa de proliferación tales como linfomas y tumores germinales, posiblemente en relación a la inestabilidad cromosómica.⁸⁶

Los efectos de la ausencia crónica de telomerasa sobre la formación de tumores parecen depender del tipo histológico tumoral. Recientemente se ha demostrado que ratones deficientes en telomerasa son resistentes al desarrollo de tumores de piel, especialmente en generaciones tardías, asociado a un acortamiento de los telómeros.⁸⁷ Sin embargo, el acortamiento telomérico en ratones heterocigotos para p53 promueve un marcado incremento en cánceres epiteliales, tales como carcinomas de mama, colon y piel.⁸⁸

Diversos estudios han mostrado que la regulación de la telomerasa es un proceso multifactorial en células de mamíferos, que implica la regulación de la expresión de los genes de codificación de las subunidades de la telomerasa, las interacciones proteína-proteína postraduccionales y la fosforilación de la proteína. Numerosos proto-oncogenes y genes supresores de tumores están comprometidos en este mecanismo, y la complejidad del control de la telomerasa se estudia habitualmente en el contexto de la carcinogénesis, aunque también en el envejecimiento.

La actividad telomerasa se controla directamente por la cantidad de transcripción del gen hTERT. Por lo tanto, el aumento de transcripción hTERT es una característica de las células cancerosas y refleja la consecuente propensión proliferativa. El aumento de la actividad de hTERT ha sido implicado en diversas enfermedades neoplásicas, incluyendo el carcinoma de mama.⁸⁹ Clínicamente, el alto nivel de hTERT en el tejido canceroso se asocia con un mal pronóstico en una serie de cánceres humanos.⁹⁰

Varios trabajos han demostrado una fuerte correlación entre la actividad telomerasa y la expresión de ARNm de hTERT en diferentes tipos de tumor sugiriendo que la transcripción del gen hTERT puede actuar como un paso regulador principal.⁹¹ Se sabe que la transcripción de hTERT tiene siete sitios de empalme alternativos, a partir de los cuales se pueden producir múltiples transcripciones alternativas específicas de tejidos y posiblemente específicas de la enfermedad. Por lo tanto, los niveles de expresión de las variantes de hTERT podrían ser el factor limitante de la velocidad en la actividad de la telomerasa. Las variantes más conocidas del ARNm de hTERT son variante de delección alfa (α -), variante de delección beta (β -) y variante de delección alfa / beta (α / β -). La evidencia experimental ha mostrado que los clones con la variante de delección β no pueden inducir actividad de telomerasa. Por otra parte, existen otras evidencias de que diferentes variantes empalmadas alternativamente podrían promover la proliferación celular y reducir la apoptosis, independientemente de la actividad enzimática de la telomerasa.⁹¹

Las mutaciones somáticas en el promotor TERT se producen con mayor frecuencia y se han identificado en varios tipos de cáncer incluyendo el melanoma, glioblastoma, carcinomas hepatocelulares, cáncer de vejiga, cáncer de tiroides y cáncer urotelial.⁷⁶

La alta frecuencia de las mutaciones del promotor TERT en una multitud de cánceres avanzados implica su papel como un mecanismo clave de la reactivación de la telomerasa.⁷⁶

Aunque TERT se reactiva en una amplia gama de cánceres, no todos los cánceres poseen mutaciones en el promotor TERT, lo que sugiere que otros mecanismos, tales

como reordenamientos cromosómicos pueden desempeñar un papel en la activación de TERT.⁷⁶

Los altos niveles de TERT se asocian con la hiperproliferación en varios tipos de cáncer; pero no se ha descrito un mecanismo común mediante el cual TERT podría controlar directamente la proliferación de células cancerosas..⁹² Sin embargo, estudios recientes han demostrado que, además del mantenimiento del telómero, la telomerasa también está implicada en la regulación de la expresión génica, la proliferación celular, la apoptosis, la señalización de WNT / β -catenina, la señalización NF- κ B, la oncogénesis dirigida por MYC, y transición epitelio-mesenquimal. Se cree que todas estas actividades de la telomerasa también contribuyen significativamente al proceso de oncogénesis.⁸³ La vía de señalización NF- κ B es un regulador maestro del desarrollo celular, y el factor clave de transcripción. La hiperactivación de NF- κ B podría promover la tumorigénesis, mediante la activación de la expresión de TERT.^{93,94,95}

➤ MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DE LA TELOMERASA

Como se ha dicho anteriormente, en la carcinogénesis intervienen mecanismos genéticos, pero también epigenéticos, que regulan la división celular, llevando a la proliferación celular descontrolada.⁹⁶

La alteración epigenética es uno de los cambios moleculares más comunes identificados en la progresión del cáncer. Recientemente, se ha observado que la epigenética puede tener un papel aún más importante que el atribuido inicialmente a este mecanismo, ya que se ha demostrado que estas alteraciones pueden estar involucradas no solo en la progresión, sino que pueden constituir el mecanismo inicial en el proceso de la

carcinogénesis, favoreciendo la aparición y el establecimiento de alteraciones genéticas, y de esta manera, la transformación celular.

Según Ting y cols, la epigenética se refiere a "cambios heredables en el patrón de expresión génica, que no son consecuencia de alteraciones en la secuencia nucleotídica del gen".⁹⁷

Los mecanismos epigenéticos incluyen la metilación aberrante del ADN, los cambios en la histona y la estructura de la cromatina por modificación postraducciona de las proteínas histonas y alteraciones en la expresión de microRNA, los cuales, en conjunto, interfieren silenciando o sobreexpresando genes que desregulan el funcionamiento celular normal, favoreciendo el inicio y la progresión tumoral.^{98,99,100} Entre estos mecanismos de modificación epigenética implicada en la programación de la expresión génica, la metilación del ADN es una de las alteraciones epigenéticas más comunes y mejor caracterizada. Se ha evidenciado su implicación en el silenciamiento de genes claves en el inicio y la progresión del cáncer ya que puede alterar la expresión génica normal, la estructura genómica y la estabilidad genética. Por otro lado están las histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4), que corresponden a proteínas que se localizan en el núcleo, alrededor de las cuales el ADN se enrolla para favorecer la compactación de la cromatina.¹⁰¹

Aunque la metilación del ADN es clave en la regulación transcripcional, modificaciones en las histonas, principalmente en las H3 y H4, permiten el empaquetamiento de la cromatina y el subsecuente silenciamiento génico, siendo dos mecanismos de regulación frecuentemente alterados en el cáncer.^{97,100}

La metilación del ADN ocurre principalmente en sitios ricos en citosinas y guaninas (islas CpG) dentro de los promotores de genes, lo que resulta en la inactivación transcripcional y el silenciamiento de genes. En las células tumorales, las islas CpG localizadas en los promotores de genes involucrados en carcinogénesis se encuentran frecuentemente hipermetiladas, evitando la expresión del gen correspondiente, y favoreciendo la pérdida de heterocigocidad; esto último corresponde a la pérdida de la expresión génica mediante el daño en el alelo de un gen en el que el otro alelo había sido previamente inactivado.

En las células tumorales varias regiones del genoma pueden estar hipermetiladas, llevando a inestabilidad cromosómica y aparición de eventos de translocaciones.^{97,102,103}

Adicionalmente, la detección de la metilación de los promotores de los genes puede utilizarse como un marcador molecular importante para ayudar a determinar el riesgo de desarrollar cáncer y de esta manera constituirse como un marcador diagnóstico temprano y adicionalmente como un potencial marcador pronóstico. Varios estudios han investigado en muestras de sangre los perfiles globales de metilación del ADN y la metilación específica del gen para desarrollar poderosos marcadores de detección del cáncer. Para medir el nivel de metilación específica de los genes, la PCR específica de la metilación y la pirosecuenciación son los métodos más frecuentemente utilizados.¹⁰⁴

La sobreexpresión de la telomerasa humana transcriptasa inversa (hTERT) está relacionada con la metilación del ADN. Se ha documentado que la hipermetilación del ADN es prominente en una región rica en isla CpG aproximadamente 600 pb por encima del sitio de inicio de la transcripción del gen hTERT utilizando PCR cualitativa

de metilación específica sobre ADN aislado de líneas celulares tumorales.^{105,90} Esta metilación provoca la reactivación del promotor TERT y, subsecuentemente, implica múltiples cambios genéticos durante la progresión neoplásica incluyendo mutaciones y reordenaciones cromosómicas.¹⁰⁶

El grupo de Castelo-Branco, ha identificado recientemente una región específica en el promotor de hTERT denominada TERT Región Hipermetilada Oncológica (THOR) que está hipermetilada y asociada con la activación de la telomerasa en el tejido canceroso.¹⁰⁷

Además, según observaciones recientes, el hallazgo de dos mutaciones altamente recurrentes en dos sitios dentro de la región promotora del núcleo de hTERT sugiere un posible mecanismo para la activación de la telomerasa en las células cancerosas. Las mutaciones recurrentes del promotor de hTERT se producen en aproximadamente el 70% de los melanomas, el 80-90% de los glioblastomas, el 60% de los carcinomas hepatocelulares, el 60% de los cánceres de vejiga, el 70% de los carcinomas basocelulares, el 50% de los carcinomas cutáneos escamosos, y hasta el 72% de los oligodendrogliomas.⁸³

El nivel y la frecuencia de las mutaciones promotoras de hTERT en el cáncer varían con los tipos de cáncer. Algunos tipos de cáncer, como el melanoma, el sarcoma dérmico pleomórfico, el liposarcoma mixoide, el glioma, el carcinoma de células uroteliales, el carcinoma de la piel y el cáncer de hígado, tienen las frecuencias más altas de las mutaciones del promotor TERT, mientras que se observan bajas frecuencias en el cáncer gástrico, cáncer de pulmón de células pequeñas y tumores del estroma gastrointestinal. Una posible explicación para estas observaciones podría ser que las

células cancerosas incipientes, que provienen de células competentes auto-renovadoras de la telomerasa, no requieren de las mutaciones del promotor TERT para regular el mantenimiento del telómero.⁸³

El mecanismo de activación de telomerasa parece depender del tipo de tumor. En los gliomas adultos, la metilación del ADN parece ser un mecanismo alternativo para la regulación positiva *de TERT* más infrecuente que las mutaciones, mientras que los tumores cerebrales pediátricos experimentan mayoritariamente hipermetilación del ADN del promotor *de TERT*.^{107,108}

Algunos compuestos como TA-65 pueden activar la telomerasa a través de c-Myc.¹⁰⁹ Por lo tanto, al diseñar una estrategia terapéutica para activar TERT en pacientes que tienen enfermedades relacionadas con la edad, la caracterización de la estrategia debe realizarse cuidadosamente para asegurar que no afecta a las vías mitogénicas o induce el desarrollo del cáncer en pacientes con deficiencia en los mecanismos supresores tumorales.⁷⁶

➤ TELOMERASA EN EL DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y

TRATAMIENTO DEL CÁNCER

La reactivación de la telomerasa se observa en más del 80-90% de los tumores, por lo que ha sido reconocida como un factor relevante en la distinción entre el cáncer y las células normales, ya que en éstas es indetectable o tiene bajo nivel de actividad,¹¹⁰ mientras que la mayoría de células neoplásicas inmortales tiene alta actividad de

telomerasa. Además, el nivel de su actividad es más alto en los tumores avanzados y metastásicos.¹¹¹

Puede ser, por tanto, considerado como un marcador casi universal de malignidad y se ha convertido así en un objetivo diagnóstico y terapéutico obvio.⁹¹ De hecho, la actividad de la telomerasa y la evaluación de la longitud de los telómeros se encuentran entre los factores más prometedores para el diagnóstico temprano de las neoplasias.¹¹²

La actividad telomerasa se mide comúnmente mediante un método basado en PCR, denominado TRAP (*Telomerasa Repeat Amplification Protocol*),^{113,114} lo que ha permitido descubrir la expresión de telomerasa en la mayoría de los tumores humanos.^{115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128}

Ming y cols,¹²⁹ realizaron un estudio para medir la actividad de la telomerasa en 60 pacientes con cáncer gástrico y 50 con úlcera péptica. La detección de la actividad de la telomerasa en el líquido del lavado peritoneal de los pacientes con cáncer gástrico fue significativamente mayor que el de positividad en el lavado peritoneal, de forma más demostrativa en los cánceres T4. El demostró que la actividad telomerasa es un complemento útil para el estudio citológico en el diagnóstico de las micrometástasis peritoneales y en los casos con mayor actividad proliferante del cáncer gástrico.

La proteína hTERT también puede ser detectada de forma fiable por inmunohistoquímica en tejidos humanos fijados en formalina, con localización en los núcleos, en particular en los nucleolos de células en división. Los tumores positivos a la telomerasa muestran heterogeneidad significativa de la expresión de la proteína hTERT.

La telomerasa también se ha convertido en una diana atractiva de la terapia del cáncer ya que la mayoría de las células cancerosas tienen una alta actividad de telomerasa, mientras que las células somáticas normales tienen una actividad muy baja o indetectable.⁷⁶ Se ha demostrado que su inhibición suprime el crecimiento de células malignas humanas *in vivo* en modelos de animales.⁷⁸ Además, también se supone que la telomerasa está asociada con la resistencia a los fármacos. Por lo tanto, controlar la enzima podría conseguir atenuar este fenómeno.¹¹⁰

El principal objetivo de la terapéutica anti-telomerasa es inducir selectivamente la apoptosis y la muerte celular en células cancerosas, minimizando al mismo tiempo los efectos sobre las células normales. La expresión diferencial entre células normales y células cancerosas, es decir, el hecho de que la reactivación de la telomerasa se encuentre en la mayoría de las células cancerosas, pero no en las células normales adyacentes, convierte a la actividad telomerasa en un potencial objetivo terapéutico para el cáncer, principalmente debido al probable bajo número de efectos secundarios observados asociados con dicho tratamiento.¹³⁰

La telomerasa es activa en la mayoría de los tumores neurales pediátricos malignos y su inhibición puede ofrecer una opción de tratamiento eficaz para estos pacientes. Diversas observaciones revelan una diferencia entre la biología de células madre de la cresta neural, que no requieren telomerasa para su auto-renovación, y las cancerosas en el sistema nervioso que sí la requieren.

A diferencia de las terapias de quimiorradiación convencionales, la inhibición de la telomerasa da como resultado una pérdida de la capacidad de auto-renovación de células iniciadoras de tumores *in vitro* e *in vivo*. Estos hallazgos sugieren que la inhibición de

la telomerasa puede ofrecer un enfoque terapéutico nuevo para estos tumores de mal pronóstico.¹³¹

La inhibición de la telomerasa representa una terapia de mantenimiento potencialmente prometedora para los ependimomas pediátricos positivos a la telomerasa tras la resección quirúrgica, cuando existe una enfermedad residual mínima.

No obstante, hay muchos factores que regulan la actividad de la telomerasa y sus subunidades. TERT, la subunidad catalítica de la telomerasa, es el objetivo más importante entre otras subunidades de la telomerasa, ya que tiene un papel importante en la reconstitución de la actividad telomerasa, así como tiene varias funciones no teloméricas en la progresión del cáncer. Desafortunadamente, no hay un fármaco eficaz dirigido a la actividad de TERT y telomerasa en el mercado hasta la fecha. La interrupción de la activación transcripcional de TERT en los promotores de TERT mutantes representa una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de un subconjunto de cánceres con promotores de TERT mutantes.⁷⁶

Se han adoptado múltiples enfoques para conseguir este objetivo mediante el desarrollo de vacunas, oligonucleótidos e inhibidores de moléculas pequeñas dirigidos a hTERT o hTR. Existen ensayos clínicos en los que se combina inmunoterapia que utilizan células dendríticas (GRVAC1), y péptido hTERT (GV1001) o péptidos crípticos (Vx-001). Sin embargo, ningún fármaco ha tenido éxito debido a los efectos adversos sobre las células madre normales, cuyas funciones dependen de la actividad de la telomerasa.¹³² Sólo un inhibidor de la telomerasa, el imetelstat (GRN163L), ha progresado hasta ensayos clínicos.^{76,133} Imetelstat deteriora la actividad de la telomerasa y el alargamiento de los telómeros por acoplamiento con TERC.^{83,134,135} Otros agentes antitumorales utilizan el

hecho de que la región promotora de hTERT está hipermetilada en la mayoría de las células tumorales.⁵⁸

Además, aunque los ensayos clínicos con inhibidores de la telomerasa han establecido la telomerasa como una diana terapéutica viable, se ha constatado que el intervalo de tiempo entre la administración del fármaco y la respuesta clínica es largo. Se requiere un tratamiento continuado para un resultado clínico exitoso, lo que puede conducir a toxicidad severa en los pacientes. Por lo tanto, un reto importante es desarrollar un inhibidor de la telomerasa que destruya rápidamente las células tumorales telomerasa-positivas sin afectar las células normales.⁸³

En el ámbito pronóstico, la determinación de THOR, región específica en el promotor de hTERT identificada por el grupo de Castelo-Branco, fue capaz de predecir la progresión tumoral y la evolución de los pacientes en varios tumores pediátricos y adultos, como el glioblastoma y el cáncer de próstata.¹⁰⁷ Estos hallazgos nos llevaron a la hipótesis de que THOR es una firma de cáncer y puede representar una herramienta de diagnóstico y pronóstico, así como un objetivo terapéutico para otros tumores, como el cáncer de mama.

4. TELOMERASA EN EL CÁNCER DE MAMA

Casi el 100% de los carcinomas de mama, expresa telomerasa, lo que lo convierte en un objetivo bueno para la terapia relacionada con esta enzima. Cabe destacar que la actividad telomerasa se ha detectado también en aproximadamente el 75% -90% de las lesiones in situ de carcinoma de mama y el 5% -14% de tejidos adyacentes al cáncer de

mama y ninguna en tejido mamario normal.¹³⁶ La evidencia de que el acortamiento de los telómeros está presente en el carcinoma in situ de mama, presupone que es un evento temprano en la transformación maligna.

Varios estudios se han centrado en la región del promotor del hTERT para determinar los factores que gobiernan su expresión, puesto que el hTERT es el factor limitador para la actividad de la telomerasa.^{137,138,139}

Existe la certeza de que acontecimientos genéticos y epigenéticos regulan la expresión del hTERT en las células normales y neoplásicas de mama, aunque los mecanismos de la regulación del hTERT siguen siendo mal entendidos.^{137,138} Algunos investigadores han demostrado que la hipermetilación de las islas de CpG desempeña un papel esencial en la expresión del hTERT en las células telomerasa-positivas del cáncer de mama.¹⁴⁰ Sin embargo, otros estudios sugieren que la metilación de la ADN del promotor del hTERT estaría asociado a la silenciación del gen.^{141,142}

También está documentado en líneas celulares tumorales que el gen hTERT presenta una metilación prominente en una región rica en isla CpG. Todo ello lleva a pensar que la hipermetilación de hTERT podría ser considerada un biomarcador para el diagnóstico de cáncer de mama.¹⁴³

Al ser hTERT negativo en tejido mamario normal, podría ser utilizado como un importante marcador tumoral para el diagnóstico.

La expresión del hTERT es perceptiblemente más alta en el tejido con cáncer, que en tejido no-canceroso de mama. Además, hTERT se incrementa en las lesiones mamarias

pre-invasivas, tal como ocurre en el cáncer ductal *in situ*, por lo que la actividad de la telomerasa es supuestamente efectiva en el primer período de la carcinogénesis.⁶³

La expresión del hTERT ha demostrado estar fuertemente asociada a una supervivencia total más baja de los pacientes con cáncer, sugiriendo que la telomerasa tiene un papel relevante en la evolución del cáncer de mama y podría tener una potencial utilidad en el diagnóstico y pronóstico del cáncer o como diana terapéutica.^{144,145,146,147}

5. TELOMERASA Y PROLIFERACIÓN CELULAR

Diversos hallazgos ponen de manifiesto la existencia de una relación entre la actividad de telomerasa y la proliferación celular. Además del papel conocido de la telomerasa en el alargamiento de telómeros para evitar la senescencia replicativa de las células, la telomerasa en las células cancerosas parece tener otras funciones que promueven la proliferación celular, invasión y resistencia a la apoptosis.¹⁴⁸

En cultivos celulares, Greider CW y cols,¹⁴⁹ observaron que la actividad de la telomerasa disminuye cuando varios diferentes tipos de células cultivadas son inducidas a diferenciarse *in vitro* perdiendo su capacidad proliferativa, mientras que los tejidos con actividad mitótica son los que expresan telomerasa. En la piel, los niveles relativamente altos de actividad de telomerasa se encontraron en la capa basal proliferativa, mientras que la dermis quiescente fue negativa a la telomerasa. La actividad de la telomerasa está también presente en el tejido endometrial y se encuentra estrechamente relacionada con la proliferación durante el ciclo menstrual. Las regiones con actividad mitótica activa de los folículos pilosos humanos y zonas proliferativas de

las criptas intestinales también tienen actividad de telomerasa.¹⁴⁹ Choi J y cols,¹⁵⁰ confirmaron que la telomerasa tiene una función activa en la proliferación de células progenitoras, y en sus estudios, esta función se ha demostrado más claramente en la epidermis.

Khattar y cols,⁹² observaron que la expresión ectópica TERT aumenta la proliferación celular, mientras que las reducciones drásticas en los niveles de TERT conducen a una dramática pérdida de proliferación sin ningún cambio en la longitud del telómero, lo que sugiere que los efectos de TERT podrían ser independientes de la longitud del telómero. Observaron también que TERT determina la tasa de crecimiento de las células cancerosas mediante la regulación directa de la síntesis global de proteínas independientemente de su actividad catalítica.⁹²

Las funciones teloméricas independientes de la telomerasa se han documentado en estudios experimentales, en los que se ha observado un aumento de la regulación de TERT en ciertos tipos de cáncer murino, como en la mama y en la piel, mientras que la expresión alterada de TERT estaba asociada con la proliferación celular.^{76,151,152,153} Cuando TERT se expresó junto con H-Ras, estas células se volvieron tumorigénicas y esta transformación fue independiente de la actividad catalítica de TERT, lo que sugiere que hTERT tiene papeles adicionales en la promoción del cáncer distintos de su actividad en los telómeros.^{76,154}

Aunque la sobreexpresión de TERT es insuficiente para conducir la tumorigénesis a menos que las células pierdan la función de genes supresores de tumores tales como TP53, PTEN, RB, varios estudios han demostrado que promueve la progresión del cáncer en presencia de otros factores oncogénicos.⁷⁶ Un ejemplo es un estudio de Shang



Li y cols, que mostró que el silenciamiento de TERT redujo la proliferación y el crecimiento de células cancerígenas sin afectar la longitud del Telómero.¹⁵⁵

El hTERT también tiene funciones no teloméricas que son independientes de su función convencional en la síntesis de telómeros. Entre las actividades independientes de los telómeros de hTERT, el papel de hTERT en la transcripción de genes ha sido investigado en detalle. Varios estudios han demostrado una participación de hTERT en la transcripción de genes.⁹³ Eso ha demostrado que la telomerasa regula directamente la expresión de genes específicos pertenecientes a la vía de señalización NF- κ B o a la vía de señalización Wnt / β -catenina,^{156,157,158,150} participa en la reparación del daño del ADN y promueve la supervivencia celular bajo condiciones de estrés oxidativo, o condiciones de estrés del retículo endoplásmico.¹⁵⁹ TERT también regula la función mitocondrial y el metabolismo celular.^{160,161,162,163}

Park J y cols,¹⁵⁸ observaron que TERT participa en la transcripción de genes de la vía de señalización Wnt / β -catenina que estimula la proliferación de células madre embrionarias. Las células madre son controladas, en parte, por vías genéticas frecuentemente desreguladas durante la tumorigénesis humana. La estimulación de la señalización de Wnt / beta-catenina o la sobreexpresión de la telomerasa es suficiente para activar las células madre epidérmicas quiescentes in vivo. También se ha demostrado en folículos pilosos, donde la sobreexpresión de TERT estimula la proliferación y la activación de la vía de señalización Wnt / β -Catenina, con el crecimiento de cabello.^{76,150} Esto revela el papel de la telomerasa como modulador transcripcional de la vía de señalización Wnt / beta-catenina.^{158,164}

Los estudios de Artandi sugieren que hTERT causa hiperproliferación en la capa basal de la zona interfolicular de la piel, de forma independiente de la actividad de la telomerasa, y que hTERT podría influir en las funciones de las células madre de dos maneras: activando la transcripción de genes dependientes de la β -catenina, o la vía de señalización Wnt / β -catenina podría regular la transcripción de TERT, lo que resulta en el mantenimiento del telómero.^{93,148}

En el cáncer, diversos estudios apoyan la existencia de una relación entre actividad telomerasa y proliferación celular.

Los estudios de Saha¹⁶⁵, revelan que la telomerasa y los marcadores de proliferación celular están asociados con la progresión de lesiones de neoplasia intraepitelial cervical. La expresión de hTERT se comparó con Ki67 y Topoisomerasa II-alfa (TPII-alfa) para determinar la actividad proliferativa de las células displásicas positivas para hTERT mediante inmunohistoquímica. Los resultados revelaron un aumento progresivo de la expresión de hTERT, junto con la actividad proliferativa de las células epiteliales displásicas de las lesiones CIN de alto grado.

Yeh y cols,¹⁶⁶ confirman con sus estudios que la diferenciación del carcinoma hepatocelular humano aumenta la regulación de la telomerasa y la expresión del Ki67. TERT también puede estar relacionada con el promotor de la Ciclina D1 y facilitar la progresión en el carcinoma escamoso de la laringe.¹⁶⁷

La relación telomerasa-proliferación se advierte también en procesos no neoplásicos. Los estudios de Wu y cols,¹⁶⁸ confirman que la actividad de la telomerasa se incrementa espontáneamente en linfocitos de pacientes con dermatitis atópica y se correlaciona con

la proliferación celular. También para Jang¹⁶⁹, la actividad de la telomerasa en la piel lesionada se asoció significativamente con Ki67.

Sin embargo, la presencia de telomerasa junto a capacidad proliferativa también tiene excepciones. Según Greider CW y cols,¹⁴⁹ algunas células inmortales carecen de actividad detectable y, por el contrario, hay una serie de condiciones hiperplásicas benignas en las que la actividad de la telomerasa no es detectada, como en los leiomas uterinos y en la hiperplasia prostática benigna.

Además, varias alternativas a TERT que no tienen actividad telomerasa son capaces de desencadenar proliferación celular o inducir mecanismos de inhibición de la apoptosis.^{64,76,170,171}

En el tejido mamario, Smith LL y cols,¹⁷² observaron que la expresión de la telomerasa en células epiteliales mamarias humanas da lugar a una menor necesidad de mitógenos exógenos y que esto se correlaciona con la inducción dependiente de la telomerasa de genes que promueven el crecimiento celular. También muestran que la inhibición de la expresión de uno de estos genes (EGFR), invierte la proliferación aumentada causada por la telomerasa. Concluyen que la telomerasa puede afectar a la proliferación de células epiteliales no sólo mediante la estabilización de telómeros, sino también por afectar a la expresión de los genes promotores del crecimiento.¹⁷²

En sus estudios, Mokbel y cols¹⁷³, en 60 muestras de mama obtenidas prospectivamente de 39 pacientes sometidas a cirugía electiva, la reactivación de la telomerasa estaba significativamente asociada con las metástasis y con la expresión de Ki67.

II. PLANTEAMIENTO DEL TEMA

El cáncer de mama es en la actualidad el tumor más frecuentemente diagnosticado en la población femenina, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo, y la principal causa de muerte por cáncer en mujeres de 20 a 60 años.

Los avances en biología molecular han permitido, mediante estudios de expresión génica, establecer una clasificación en subtipos moleculares, con características biológicas y evolutivas diferentes, que proporciona una valiosa información sobre las opciones terapéuticas. Sin embargo, sigue existiendo desconocimiento de la historia natural del cáncer de mama, principalmente en los tumores que no expresan receptores hormonales ni Her2 o triple negativos, lo que precisa de nuevos marcadores que ayuden a establecer mejor el pronóstico y/o que proporcionen nuevas dianas terapéuticas.

La expresión de la Telomerasa es un importante mecanismo que permite la adquisición de un potencial replicativo ilimitado en los tumores, una de las características esenciales del cáncer. Debido a su actividad especializada como transcriptasa inversa, alarga los telómeros compensando así su acortamiento durante la replicación del ADN. La telomerasa transcriptasa inversa (TERT), o unidad catalítica del complejo telomerasa determinante de la actividad telomerasa, se expresa en una gran mayoría de los cánceres humanos, incluido el cáncer de mama. Sin embargo, no se expresa en la mayor parte de los tejidos normales, lo que la convierte en un prometedor marcador del cáncer en sus etapas iniciales, además de una posible diana terapéutica.

Como factor pronóstico, la determinación de la actividad telomerasa ha demostrado su utilidad en varios tipos de cáncer, si bien en el cáncer de mama los resultados han sido contradictorios. No obstante, dada su conocida correlación con la proliferación celular,

factor de gran relevancia en el pronóstico del carcinoma mamario, la actividad de la telomerasa se propugna también como marcador pronóstico en estos tumores. La actividad de la telomerasa se regula a diferentes niveles, siendo uno de los más importantes la metilación del ADN. Especialmente, se ha descubierto una región en el promotor de TERT específicamente hipermetilada denominada THOR (*TERT Hypermethylated Oncological Region*) que se asocia con activación de la Telomerasa en tejido neoplásico, y además, se encuentra hipometilada en tejidos normales.

• HIPOTESIS DE TRABAJO

En este trabajo partimos de la hipótesis basada en que la cuantificación de la hipermetilación de THOR, como medida indirecta de la actividad de Telomerasa, es un marcador de malignidad en la mama, es de utilidad pronóstica y está relacionada con la proliferación celular y con otros parámetros pronósticos clásicos en el cáncer de mama.

➤ OBJETIVOS

De acuerdo con las hipótesis establecidas, los objetivos de este estudio comprenden:

- Comprobar el valor de la hipermetilación THOR como marcador específico de malignidad en tejido mamario, comparando muestras de mama normal y neoplásicas.
- Establecer la relación de THOR, como marcador de actividad telomerasa, con los parámetros pronósticos clínico-patológicos clásicos, los marcadores tumorales inmunohistoquímicos y el subtipaje molecular subrogado a IHQ del cáncer de mama.
- Conocer la relación de la actividad telomerasa con el nivel de proliferación celular medida mediante Ki67.
- Evaluar la relación de la actividad telomerasa con la supervivencia de pacientes con cáncer de mama.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

➤ DISEÑO

Estudio de cohorte retrospectivo. Pacientes intervenidas de cáncer de mama por el Servicio de Ginecología del Hospital de Faro en Algarve (Portugal), en el período comprendido entre janeiro de 2004 y diciembre de 2010. El estudio ha tenido la aprobación del Comité de Ética del Hospital de Faro (Portugal).

➤ POBLACIÓN

Nuestra población objeto de estudio incluye 320 pacientes con carcinoma invasivo de mama, pertenecientes al área de salud de la comunidad de Algarve (Portugal), basándose en criterios de inclusión y exclusión prefijados y detallados a continuación:

Criterios de inclusión:

1. Cáncer de mama invasivo en estadios I, II y III.
2. Pacientes mujeres tratadas con mastectomía parcial o total con disección axilar.
3. Casos con material histopatológico suficiente, representativo de la lesión.

Criterios de exclusión:

1. Carcinomas in situ.
2. Cáncer invasivo en estadio IV
3. Pacientes sin datos de seguimiento

Del total de 320 pacientes revisados con carcinoma invasivo de mama, se incluyeron 112 mujeres que cumplían con los criterios de selección.

➤ ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO: ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN KI67

Protocolo de inmunotinción

Previo a la tinción inmunohistoquímica de los cortes, se procedió a determinar el método de desenmascaramiento antigénico más apropiado, en cortes de tejido control de conocida positividad. De los bloques representativos se realizaron cortes de parafina de 4-5 micras de grosor, en portas tratados (ChemMate,Dako, Copenhague, Dinamarca). Antes de la inmunotinción los cortes de tejido fueron sometidos a un proceso de desenmascaramiento antigénico en módulo PT-Link. La técnica inmunohistoquímica se ha llevado a cabo en el equipo de inmunotinción automatizado Autostainer de Dako, usando como método de visualización de la reacción antígeno-anticuerpo el sistema EnVision (DAKO). De forma resumida: se realizó bloqueo de la peroxidasa endógena (DAKO Peroxidase Block), incubación con anticuerpo primario, incubación con el polímero marcado y luego con el sustrato cromógeno (DAB), contratinción con hematoxilina y montaje.

Como control de calidad, la inmunotinción se ha realizado incluyendo un correspondiente control positivo y un control negativo, donde el anticuerpo primario fue sustituido por suero no inmune de la misma especie que el anticuerpo primario.

Valoración del Ki67

En la evaluación de la tinción inmunohistoquímica con MIB-1 (Ki67) sólo se tuvo en cuenta la tinción nuclear, además de las figuras mitóticas teñidas con este marcador. Como control positivo interno se identificaron en cada caso bien figuras mitóticas teñidas, o bien positividad en células de conductos normales, linfocitos o células endoteliales. La inexistencia de este tipo de control interno fue causa de desestimación

del caso. El valor de Ki67 se definió como el porcentaje de células teñidas entre el número total de células tumorales malignas de carcinoma de mama. En cada caso se contaron al menos 1000 células, localizadas en diversos campos de la preparación histológica, con un objetivo de 40x de aumento. Cada una de las preparaciones fue evaluada a pequeño aumento para establecer el grado de heterogeneidad de la distribución de las células teñidas. Si la distribución de los núcleos teñidos era homogénea, se contaron al menos tres campos seleccionados de forma aleatoria. En los casos en los que la distribución era creciente hacia el borde del tumor se utilizaron tres campos en la periferia del tumor, considerada como la parte más biológicamente activa del tumor. Cuando se encontraron zonas con cantidad incrementada de células marcadas (puntos calientes), se comenzó el conteo por las mismas, pero se continuó con otras adyacentes independientemente de la cantidad de células marcadas.

➤ ESTUDIO DE METILACIÓN : TELOMERASA

- Extracción de DNA

El ADN genómico se extrajo de secciones de tejido FFPE utilizando el Maxwell16 FFPE Tissue LEV Kit de purificación de ADN (Promega). El área tumoral de cada bloque de tejido FFPE se seleccionó cuidadosamente para asegurar que la muestra de ADN no estaba contaminada con ADN del tejido normal adyacente al tumor. En primera etapa, para desparafinar y digerir las muestras, se añadieron 20 µl de proteinasa K y 180 µl de tampón de incubación a cada muestra de tejido FFPE. Las muestras se incubaron durante la noche a 70°C. En segunda etapa, se añadieron 400 µl de tampón de lisis a cada muestra. Posteriormente, las muestras se insertaron en el Rack de Cartuchos

Maxwell® 16 LEV para purificación automatizada de ADN. Después del aislamiento del ADN, la concentración de ADN se midió con el sistema nanodrop 2000.

- **Análisis de metilación del ADN con pirosecuenciación**

Se realizó una pirosecuenciación cuantitativa de bisulfito de sodio para THOR. En primer lugar, el ADN fue tratado con bisulfito, con el fin de permitir la diferenciación entre citosinas no metiladas a uracilo, y citosinas metiladas.

A continuación, el ADN tratado con bisulfito se amplificó usando cebadores específicos y luego se analizó nuestra región de interés mediante pirosecuenciación. Los ensayos dirigidos se diseñaron utilizando el software de diseño de ensayo PyroMark 1.0 (Qiagen). Se utilizaron cebadores GGAGGTTTTGGGAATAG para PCR y pirosecuenciación. La región diana del ensayo fue de 36 pb de longitud que comprende 5 sitios CpG cuyas coordenadas genómicas son las que se definen a continuación.

Las posiciones de las sondas del THOR (hg19) tienen las siguientes coordenadas:

- Posición 1 chr5:1295586
- Posición 2 chr5:1295590
- Posición 3 chr5:1295593
- Posición 4 chr5:1295605
- Posición 5 chr5:1295618

El cálculo de % de metilación de THOR se realizó como un valor medio de estos sitios.

➤ RECOGIDA DE DATOS

Revisión en consultas externas y en archivo de historias clínicas, siguiendo un protocolo en el que hemos registrado 29 variables, objeto de nuestro estudio.

El diagnóstico se confirmó con previa biopsia intraoperatoria y la técnica quirúrgica empleada se basó en el tamaño tumoral y la presencia o no de multifocalidad. Todas las piezas de resección y los ganglios axilares fueron examinadas. Los grados histológicos se obtuvieron mediante sistema de puntuación, de acuerdo con los criterios de clasificación de Scarff-Bloom-Richardson.

La estadificación se basó en el sistema TNM modificado por la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*).

Los datos del seguimiento se obtuvieron en las propias consultas externas. Cuando no era posible, la revisión del historial clínico se realizó en el archivo de historias clínicas del hospital de Faro (Portugal).

➤ DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DEL ESTUDIO

1) Edad. Se recogió la edad (en años) de las pacientes en el momento del diagnóstico de la enfermedad. Teniendo en cuenta que la media de la edad ha sido de 58,17 años (Fig.1), se han establecido dos grupos:

- a) Pacientes con edad < 60 años. En la base de datos recibe el valor de 0.
- b) Pacientes con edad ≥ 60 años. En la base de datos recibe el valor de 1.

2) Sexo. Agrupado en 2 categorías:

- a) Mujeres. En la base de datos recibe el valor de 0.
- b) Hombres. En la base de datos recibe el valor de 1.

3) Residencia. Se establecieron 2 grupos, dependiendo del lugar de residencia:

- a) Sotavento del Algarve. En la base de datos recibe el valor de 0.
- b) Barlavento del Algarve. En la base de datos recibe el valor de 1.

4) Estado menopaúsico. Se dividieron las pacientes en 2 grupos:

- a) Pacientes premenopaúsicas: En la base de datos recibe el valor de 0.
- b) Pacientes postmenopaúsicas: En la base de datos recibe el valor 1.

5) Estadificación. Basándose en el sistema de clasificación TNM, se atribuyén las siguientes categorías de 1 a 6 en la base de datos (1-Estadio IA o IB; 2- Estadio IIA; 3- Estadio IIB; 4- Estadio IIIA; 5- Estadio IIIB; 6- Estadio IIIC).

Para el estudio estadístico analítico se reagruparon en Estadios I, II, III.

6) N° de Focos. Determina dos categorías:

- a) Tumores únicos: existe un único foco de cáncer invasivo. Se le atribuye valor 0.
- b) Tumores multifocales: hubo 2 o más focos de cáncer invasivo en la misma mama. En la base de datos recibe un valor de 1.

7) Localización. Se ha dividido en tres categorías:

- a) Tumores bilaterales: En la base de datos se le atribuye un valor de 0.
- b) Tumores en la mama izquierda. En la base de datos recibe un valor de 1.
- c) Tumores en la mama derecha. En la base de datos recibe un valor de 2.

8) Tipo Histológico. De acuerdo con el tipo histológico del tumor, se atribuyen las siguientes categorías de 1 a 12 en la base de datos (1. Ductal; 2. Con comedocarcinoma < 25%; 3. Con comedocarcinoma > 25%; 4. Inflamatorio; 5. Mucinoso; 6. Medular; 7. Papilar; 8. Epidermoide; 9. Paget; 10. Carcinosarcoma; 11. Lobulillar; 12.Ductal + Lobulillar).

9) Grado Histológico. Se establecieron tres categorías basándose en el sistema de puntuación de la escala de clasificación de Bloom-Richardson.

a) Grado histológico 1: de 3- 5 puntos. Corresponde a tumores bien diferenciados.

En la base de datos esta categoría recibe un valor de 1.

b) Grado histológico 2: de 6-7 puntos. Comprende tumores moderadamente diferenciados. Se le atribuye un valor de 2 a esta categoría.

c) Grado histológico 3: de 8 –9 puntos. Incluye los tumores indiferenciados. Se le asigna un valor de 3 en esta categoría.

Para el estudio analítico, se dividió el conjunto de casos en dos grados:

a) Bajo grado: los considerados de grado histológico 1 y 2 en el esquema anterior.

b) Alto grado: los considerados de grado histológico 3 en el esquema anterior.

10) Receptores de Estrógenos (RE). Se estableció el valor 1 (+) a los casos con porcentaje del 10% o más de células con tinción nuclear positiva y un valor de 0 (-) a un porcentaje de 0 o inferior al 10%.

11) Receptores de Progesterona (RP). Se definieron dos categorías para la variable RP: al porcentaje del 10% o más de células con tinción nuclear positiva se le asignó el valor de 1 (+) y de 0 (-) a la ausencia o porcentaje inferior al 10%.

12) p185C-erbB-2 (HER2). Se consideraron dos grupos de casos:

a) HER2 negativos. En la base de datos recibe el valor de 0.

b) HER2 positivos. En la base de datos recibe el valor de 1.

13) Clasificación Molecular. De acuerdo con la clasificación molecular de St. Gallen de tumores de mama, se estableció, en función de la expresión inmunohistoquímica de RE/RP, Her2 y Ki67, los subtipos moleculares subrogados:

1. **Luminal A** : RE o RP (+), Her2 (-), Ki67 <14%
2. **Luminal B** : RE o RP (+), Her2(-/+), Ki67 \geq 14%
3. **HER2**: RE y RP (-) y Her2 (+)
4. **Basal Like**: RE y RP (-) y Her2 (-)

14) Índice de proliferación celular Ki67. Con esta variable se ha trabajado con tres umbrales diferentes: 14%, 20% y 40%.^{174,175,176}

En cada uno de ellos, los casos se distribuyeron en 2 categorías:

- a) Ki67 < 14%, < 20% y < 40%. En la base de datos recibe el valor de 1.
- b) Ki67 \geq 14%, \geq 20% y \geq 40%. En la base de datos recibe el valor de 2.

15) Metilación de la Telomerasa. Se ha valorado considerando niveles de metilación de ADN del 20% y 40%.^{107,177}

Para todos los casos se atribuyeron las siguientes categorías:

- a) Hipometilación ADN Telomerasa < 20% y < 40%. En la base de datos ha recibido el valor de 1.
- b) Hipermetilación ADN Telomerasa \geq 20% y \geq 40%. En la base de datos ha recibido el valor de 2.

16) Tamaño tumoral (pT). De acuerdo con la medición del tamaño del tumor realizada durante el estudio macroscópico de las lesiones, los casos se agruparon en 6 categorías: 0. pTx, 1.pT1 microscópico, 2.pT1a \leq 0,5 cm, 3. pT1b 0,5-1 cm, 4.pT1c >1-2 cm, 5.pT2 >2-5 cm; 6.pT3 >5 cm. Para el estudio estadístico analítico se reagruparon los tumores en dos grupos: \leq 2 cm y > 2 cm.

17) Número de ganglios axilares afectados (pN). Atendiendo al número de ganglios afectados identificados por el patólogo, se consideraron las siguientes opciones: 0.pNx; 1-pN0; 2.pN1 microscópico; 3.pN1 1-3; 4.pN2 4-9; 5. pN3 \geq 10.

También, finalmente, los pacientes se dividieron en dos grupos, aquellos con ganglios no afectos y los pacientes con ganglios afectados.

18) Márgenes. Se recogieron en un primer tiempo los datos relativos a la distancia, en cm, de los bordes de resección tras la cirugía, estableciendo: (1. márgenes > 1cm; 2. márgenes > 0,5 cm - 1 cm; 3. márgenes 0,1 - 0,5 cm; 4. márgenes afectados).

Para la estadística analítica se reagruparon los casos en dos grupos: casos con bordes libres y casos con bordes afectados.

19) Invasión linfovascular. Inicialmente se tabularon los casos: 0. Sin invasión vascular; 1. Invasión arterial o venosa y 2. Invasión linfática. Posteriormente, reagrupamos en dos categorías: tumores sin invasión vascular o linfática y tumores con afectación linfovascular.

20) Cirugía. De acuerdo con el tipo de cirugía efectuada, se consideraron las siguientes categorías:

1. Tumorectomía (con ganglio centinela negativo)
2. Mastectomía simple (con ganglio centinela negativo)
3. Cirugía conservadora
4. Mastectomía radical modificada de Madden o Patey.

21) Quimioterapia (QT). Se categorizaron las pacientes tratadas o no con quimioterapia y si esta fue en neoadyuvancia o después de la cirugía (adyuvante): 0. No, 1. QT Neoadyuvante, 2. QT Adyuvante, 3. QT Neoadyuvante + Adyuvante.

22) Trastuzumab. De acuerdo con el tratamiento efectuado, se consideraron las siguientes categorías:

- a) Sin Trastuzumab. En la base de datos recibe el valor de 0.
- b) Con Trastuzumab. En la base de datos recibe el valor de 1.

23) Radioterapia (RT). Se estableció si las pacientes habían recibido o no tratamiento radioterápico y si ocurrió antes (neoadyuvante) o después de la cirugía (adyuvante), considerando:

- 0. Sin tratamiento radioterápico.
- 1. RT Neoadyuvante.
- 2. RT Adyuvante.
- 3. RT Neoadyuvante + Adyuvante.

24) Hormonoterapia. Determina las pacientes que han recibido o no tratamiento adyuvante durante al menos 5 años con Tamoxifeno, Anastrozol, Letrozol o Exemestano, o Tamoxifeno en los primeros 2 años seguido de Anastrozol, Letrozol o Exemestano por 5 años como mínimo.

De acuerdo con las pautas de hormonoterapia se consideraron los siguientes grupos:

0. No; 1. Tamoxifeno; 2. Anastrozol; 3. Letrozol; 4. Exemestano; 5. Tamoxifeno seguido de Anastrozol; 6. Tamoxifeno seguido de Letrozol; 7. Tamoxifeno seguido de Exemestano.

25) Recidiva local. Definida como la reaparición del tumor en la misma mama tras la cirugía. Si ha ocurrido recidiva local, en la base de datos recibe el valor de 1.

26) Metástasis. Se consideraron los siguientes grupos: 1. Metástasis múltiples; 2. Metástasis pulmonares; 3. Metástasis óseas; 4. Metástasis hepáticas; 5. Metástasis cerebrales; 6. Metástasis para la otra mama; 7. Metástasis supraclaviculares.

27) Estado de los pacientes en la última revisión. De acuerdo con la situación del paciente al final del estudio, se contemplaron las siguientes situaciones:

0. Muerte con tumor.
1. Muerte por otras causas.
2. Vivo con Tumor.
3. Vivo sin tumor.

28) Intervalo Libre de Enfermedad Tiempo en meses, que transcurre desde el diagnóstico de la lesión (tras confirmación histológica) hasta la primera recidiva y/o muerte de la (s) paciente (s) o cierre del estudio en diciembre de 2016.

29) Tiempo de Supervivencia. Tiempo en meses que transcurre desde el diagnóstico de la lesión (tras confirmación histológica) hasta la muerte del paciente o cierre del estudio en diciembre de 2016.

➤ ESTUDIO ESTADÍSTICO

Una vez la base de datos completada y actualizado el seguimiento (a 31 de diciembre de 2016) hemos procedido a una descripción de todos los parámetros clínico-patológicos convencionales (variables de confusión), supervivencia (variable dependiente) y de los marcadores biomoleculares (índice de proliferación Ki67 y grado de metilación de la telomerasa), de todos los carcinomas de mama incluidos en el estudio.

El análisis estadístico fue realizado mediante software estadístico SPSS (versión 23.0).

Se ha realizado una estadística descriptiva básica inicial, seguida de análisis univariantes utilizando el test de chi-cuadrado, t-test, ANOVA (dependiendo de que las

variables tengan carácter numérico categorizado o variables numéricas continuas). Se han usado métodos no-paramétricos (*U* de Mann–Whitney y test de Kruskal–Wallis) para datos sin distribución normal. La supervivencia global y el intervalo libre de enfermedad se han analizado mediante el método de Kaplan–Meier, utilizándose como estadísticos de contraste el Breslow y el *logrank*.

En nuestro estudio, se realizó análisis de curvas ROC con el fin de identificar con precisión un óptimo umbral para la metilación TERT en pacientes con cáncer de mama. Para los datos obtenidos de nuestra muestras de 112 pacientes con cáncer de mama, se encontró que el área bajo la curva (AUC) era 0.521 y el umbral de la metilación basado en el índice de Youden fue 40%. Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar si el umbral de 40% es válido para el diagnóstico y pronóstico de cáncer de mama, con el fin de identificar con precisión un óptimo umbral para la metilación de TERT en las pacientes con cáncer de mama.

➤ LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La determinación de los patrones de metilación de TERT puede ayudar a identificar las pacientes con cáncer de mama de alto riesgo, permitiendo así la optimización de las modalidades de tratamiento. Sin embargo, se trata de un estudio retrospectivo con pequeño tamaño muestral. Estudios posteriores con grandes tamaños de muestra son, por tanto, esenciales para definir las implicaciones clínicas de la metilación de TERT en el cáncer de mama.

IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se procedió al estudio descriptivo, con análisis de la supervivencia global y libre de enfermedad de las 112 pacientes de nuestro estudio con carcinoma de mama invasivo.

A. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

➤ PARÁMETROS CLÍNICOS

1. EDAD

La edad media en el diagnóstico fue de 58,17 años (rango 29-87 años) y la distribución por edades al diagnóstico queda representada en las figuras 1 y 2.

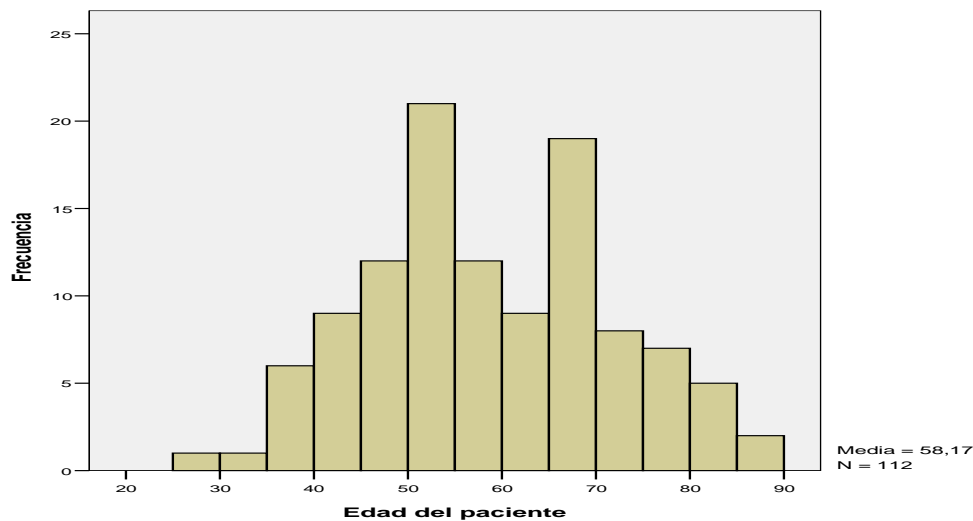


Figura 1. Distribución por grupos etarios

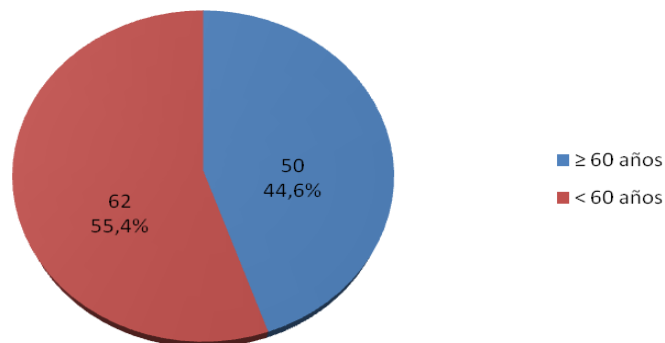


Figura 2. Frecuencia de pacientes de < 60 años y ≥ 60 años

2. MENOPAUSIA

Un 31,3% de las pacientes (35 casos) eran premenopáusicas y un 68,7% (77 casos) postmenopáusicas (Fig. 3).

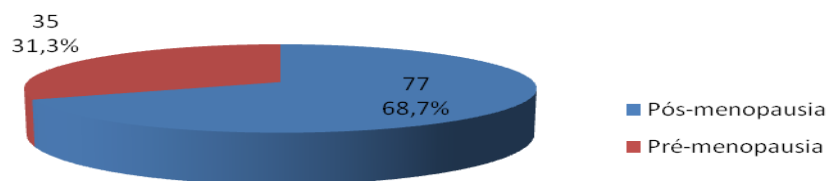


Figura 3. Pacientes pre/postmenopausicas

3. LOCALIZACIÓN

En nuestra serie, un 53,6% de casos (60) el tumor estuvo localizado en la mama izquierda, un 44,6% de casos (50) en la mama derecha y un 1,8% de los casos (2) con localización mamaria bilateral (Fig. 4).

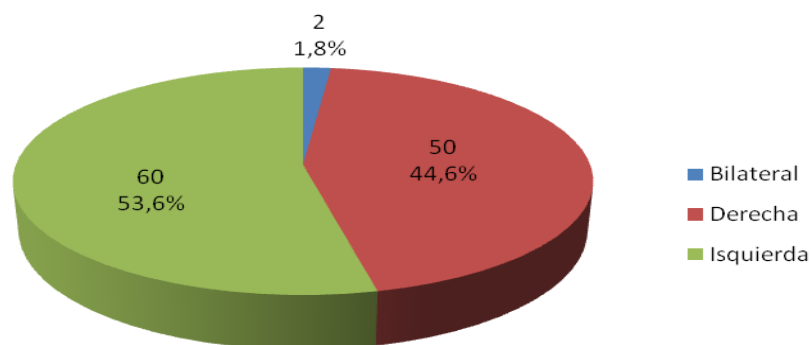


Figura 4. Frecuencia según localización del tumor

4. TUMORES UNI/MULTIFOCALES

La mayoría de los tumores 90,2% (101 casos) eran unifocales y sólo en el 9,8% de las pacientes (11 casos) se observó multifocalidad del tumor (Fig. 5).

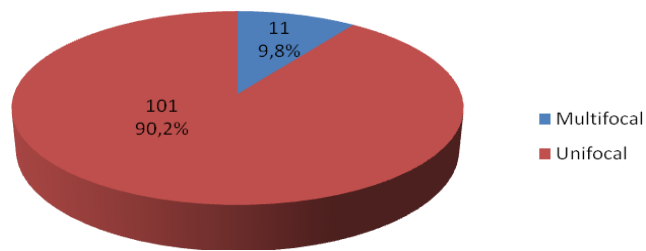


Figura 5. Frecuencia tumores según la focalidad

➤ TRATAMIENTOS

5. TIPO DE CIRUGÍA

El tipo de cirugía más frecuente fue la mastectomía radical modificada (Madden o Patey), con un 46,4% (52 casos), seguida de la cirugía conservadora con 43,8% (49 casos), la tumorectomía con 7,1% (8 casos) y la menos frecuente fue la mastectomía simple con un 2,7% (3 casos) (Fig. 6).

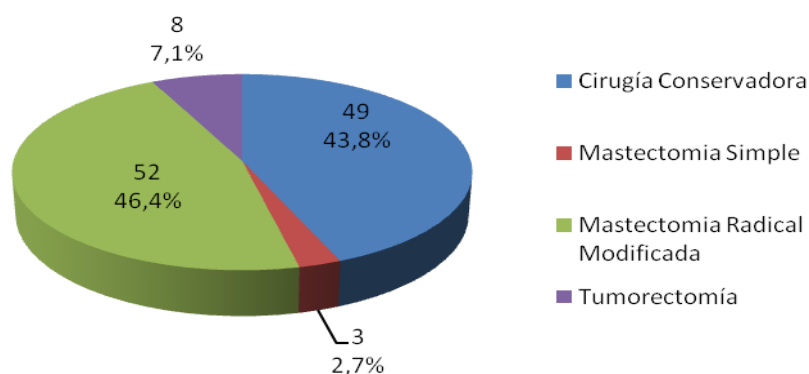


Figura 6. Frecuencia según el tipo de cirugía

6. QUIMIOTERAPIA

De los 112 pacientes de nuestro estudio, 37 casos (33%) no fueron tratados con quimioterapia y los 75 casos (67%) restantes han recibido tratamiento con quimioterapia adyuvante (Fig. 7).

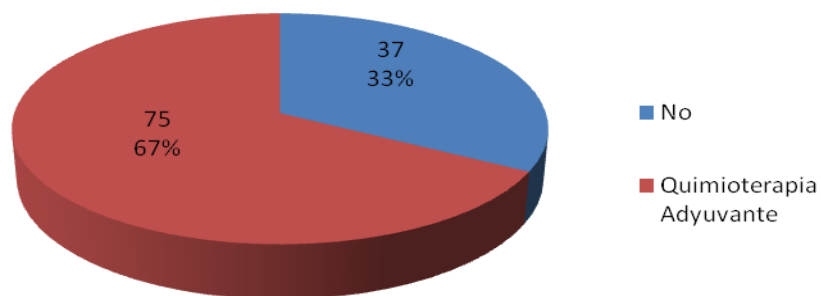


Figura 7. Frecuencia de pacientes atendiendo al tratamiento quimioterápico recibido

7. TRASTUZUMAB

En nuestra serie, sólo 9 casos (8%) han recibido tratamiento adyuvante con trastuzumab (Fig. 8).

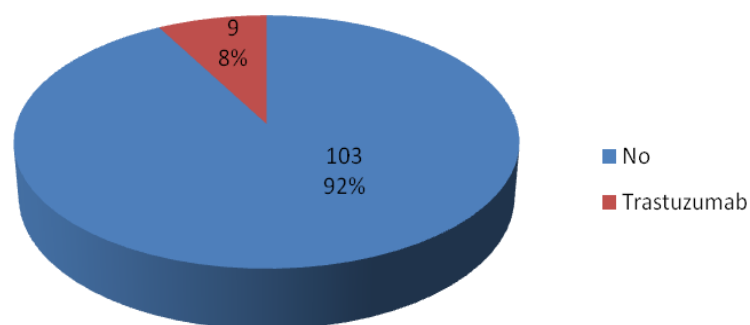


Figura 8. Frecuencia de pacientes en función del tratamiento con Trastuzumab

8. RADIOTERAPIA ADYUVANTE

De los pacientes estudiados, tan sólo 12 casos (10,7%) no recibieron tratamiento radioterápico, mientras que en 100 casos (89,3%) han recibido radioterapia adyuvante (Fig. 9).

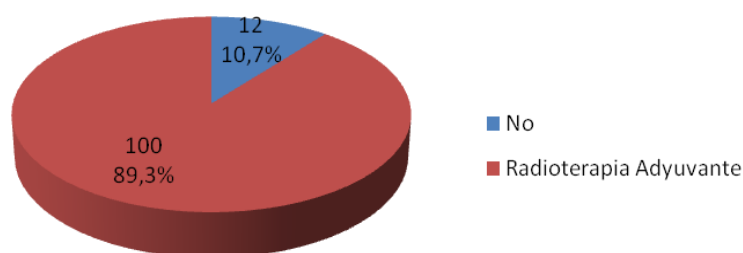


Figura 9. Frecuencia de pacientes en función del tratamiento de radioterapia administrado

➤ PARÁMETROS ANATOMOPATOLÓGICOS

9. TAMAÑO TUMORAL

El tamaño del tumor más frecuente fue el pT2 ($> 2 \text{ cm} \leq 5 \text{ cm}$), con un 51,8% (58 casos), seguida del pT1c ($> 1 \text{ cm} \leq 2 \text{ cm}$), con un 37,5% (42 casos), el pT1b ($> 0,5 \text{ cm} \leq 1 \text{ cm}$), con un 9,8% (11 casos) y del pT1a ($\leq 0,5 \text{ cm}$), con un 0,9% (1 caso) (Fig. 10).

El 48,2% de los casos tenían tumores $\leq 2 \text{ cm}$ y el 51,2% presentaron tumores $> 2 \text{ cm}$.

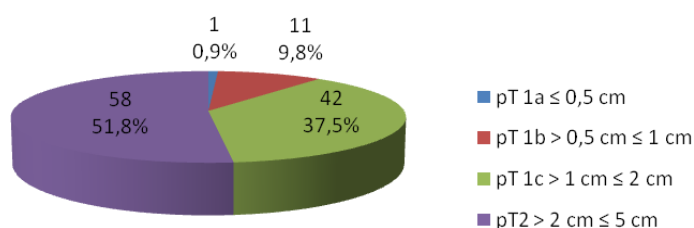


Figura 10. Frecuencia de casos según el tamaño del tumor (cm)

10. TIPO HISTOLÓGICO

En nuestra serie el 80,3% de los casos (90), eran carcinomas ductales invasores, siendo el tipo más frecuente, junto a un 17% (19 casos) de carcinomas lobulillares. Con menor frecuencia encontramos 1 caso (0,9%) de carcinoma mucinoso, 1 caso (0,9%) de carcinoma medular y 1 caso (0,9%) de carcinoma mixto (ductal y lobulillar) (Fig. 11).

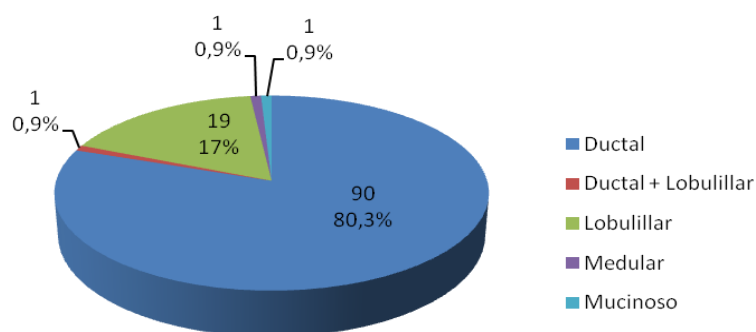


Figura 11. Frecuencia de pacientes según el tipo histológico

11. GRADO HISTOLÓGICO

Según la clasificación usada con tres categorías, 75 casos (67%) de los carcinomas de mama de nuestra serie, fueron catalogados como grado 2 o moderadamente diferenciados, 26 casos (23,2%) se clasificaron como grado 3 o pobremente diferenciados y 11 casos (9.8%) como grado 1 o bien diferenciados (Fig. 12).

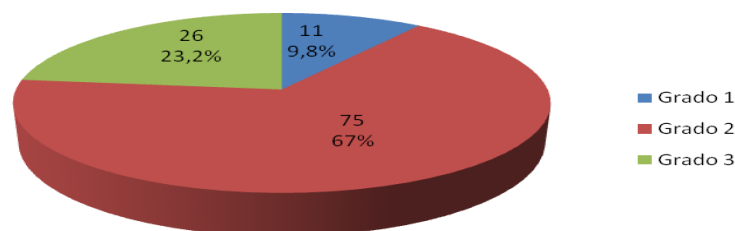


Figura 12. Frecuencia de pacientes según el grado histológico

12. INVASIÓN LINFOVASCULAR

De los 112 casos estudiados, 48,2% (54 casos) no presentaron invasión vascular, mientras que un 33,9% (38 casos) presentaron invasión vascular y solo un 17,9% (20 casos) presentaron invasión linfática (Fig. 13).

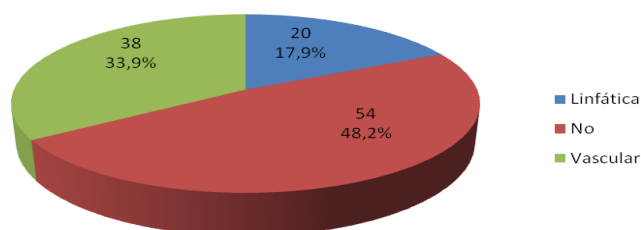
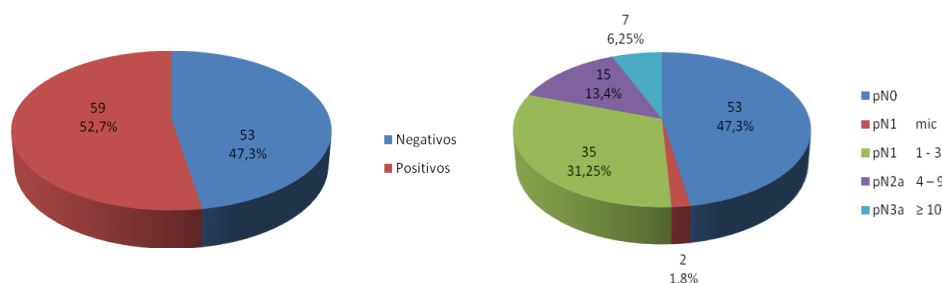


Figura 13. Frecuencia de pacientes según la presencia o no de invasión linfovascular

13. AFECTACIÓN GANGLIONAR

El 52,7% de casos (59) presentaron afectación ganglionar (Fig. 14). De estos un 1,8% (2 casos) pN1 mic, un 31,25% (35 casos) pN1 (1 – 3 ganglios afectados), un 13,4% (15 casos) pN2a (4 – 9 ganglios afectados) y un 6,25% (7 casos) pN3a (10 o más ganglios afectados). En un 47,3% (53 casos) había ausencia de afectación ganglionar (Fig. 15).



Figuras 14 y 15. Frecuencia de pacientes según la afectación ganglionar

14. EXPRESIÓN DE RECEPTORES HORMONALES (RH) DE ESTRÓGENOS (RE) Y PROGESTERONA (RP)

Consideramos como RH positivos cuando RE y/o RP eran positivos y negativos cuando RE y/o RP eran negativos.

De los 112 casos estudiados, el 75% (84 casos) presentaron receptores de estrógenos y progesterona positivos y en sólo 25% (28 casos) hubo ausencia de inmunoexpresión de RE y RP (Fig. 16).

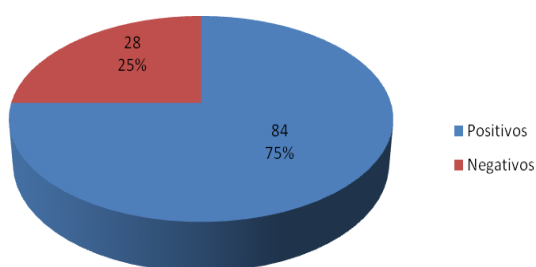


Figura 16. Frecuencia de pacientes según la inmunoexpresión de RH

- *Receptores de estrógenos (RE)*

Ochenta y dos casos (73,2%) presentaron receptores de estrógenos positivos, mientras que sólo un 26,8% (30 casos) no expresaron receptores de estrógenos (Fig. 17).

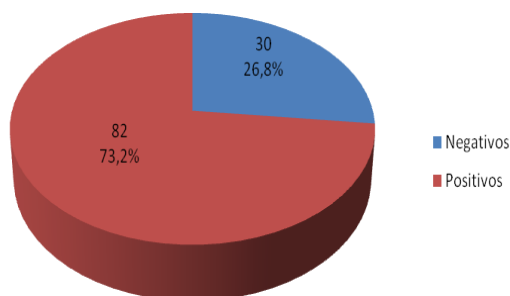


Figura 17: Frecuencia de pacientes según la inmunoexpresión de RE

- *Receptores de progesterona (RP)*

En nuestra serie, un 58,9% (66 casos) presentaron receptores de progesterona positivos, mientras 41,1% (46 casos) no inmunoexpresaron receptores de progesterona (Fig. 18).

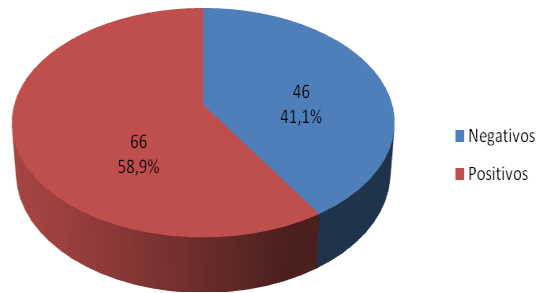


Figura 18. Frecuencia de pacientes según la inmunoexpresión de RP

15. HER2

De los 112 casos estudiados, un 14,3% (16) presentaron expresión de Her2, mientras que un 85,7% (96 casos) no mostraron positividad para Her2 (Fig. 19).

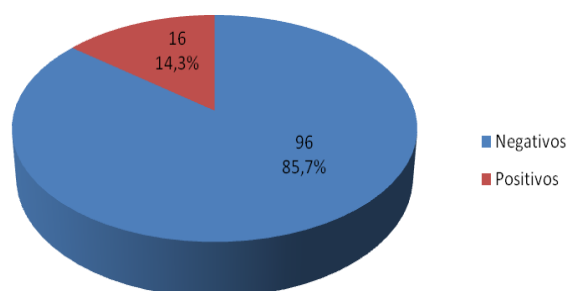


Figura 19. Frecuencia de pacientes según la expresión de HER2

16. ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN KI67

El valor medio de Ki67, en porcentaje de núcleos de células tumorales teñidas, fue de 23,87 (rango 1 - 95) (Fig. 20).

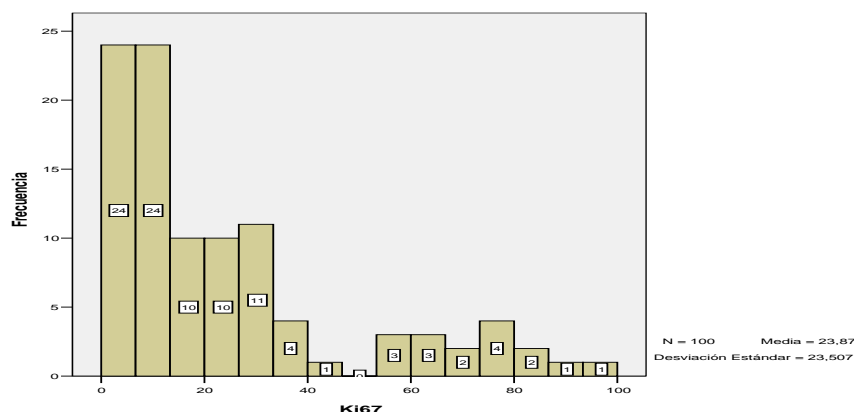


Figura 20. Histograma de distribución de los valores del Ki67

Cuando estudiamos el índice proliferativo y la distribución de los valores del Ki67, establecimos 3 niveles de proliferación, siendo bajo cuando Ki67 es $< 14\%$, $< 20\%$ o $< 40\%$ y alto con $\text{Ki67} \geq 14\%$, $\geq 20\%$ o $\geq 40\%$. Según esto, nuestro estudio, muestra que la mayoría de los casos fueron de bajo índice proliferativo 52% (52 casos), 58% (58 casos) y 83% (83 casos) para valores menores de 14%, 20% y 40% respectivamente y fue alto en el resto de la población 48% (48 casos), 42% (42 casos) y 17% (17 casos) para valores iguales o superiores a 14%, 20% y 40% (figs. 21, 22 y 23).

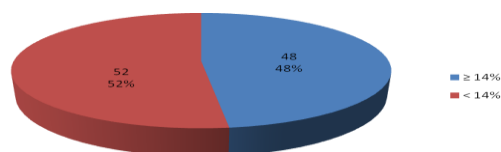


Figura 21. Expresión Ki67 (umbral 14%)

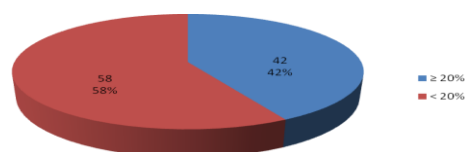


Figura 22. Expresión Ki67 (umbral 20%)

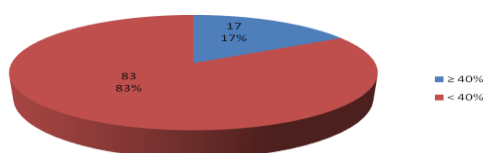


Figura 23. Expresión Ki67 (umbral 40%)

17. ESTADIO

Los estadios I y IIA han sido los más frecuentes, con 32,1% (36 casos) cada, seguidos del estadio IIIA 19,7% (22 casos) y del estadios IIB con 16,1% (18 casos) (Fig. 24).

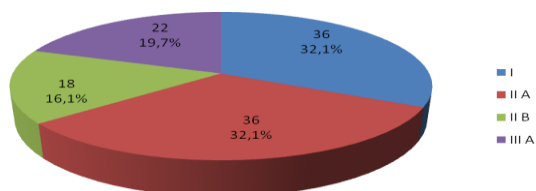


Figura 24. Frecuencia de pacientes por estadios clínicos

18. SUBTIPO MOLECULAR SUBROGADO IHQ

El subtipo molecular más frecuente fue el luminal B, con un 65,2% (73 casos), seguido del *basal like* con un 19,6% (22 casos), luminal A con un 9,8% (11 casos) y el menos frecuente fue el HER2 positivo con un 5,4% (6 casos) (Fig. 25).

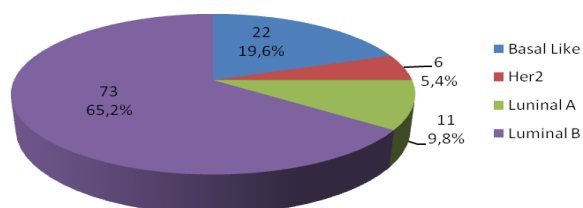


Figura 25. Frecuencia de los subtipos moleculares IHQ

19. METILACIÓN DE TELOMERASA

• TEJIDO MAMARIO NORMAL

Hemos estudiado la telomerasa en 6 casos de referencia con tejido mamario normal y en 112 casos de cáncer de mama invasivo de nuestro estudio, constatando valores de metilación de ADN < 20% en todos los casos de tejido mamario normal, mientras que de los 112 casos de cáncer de mama invasivo, fue superior al 20%, definido como hipermetilación de ADN en 105 casos (93,75%) (Fig. 26).

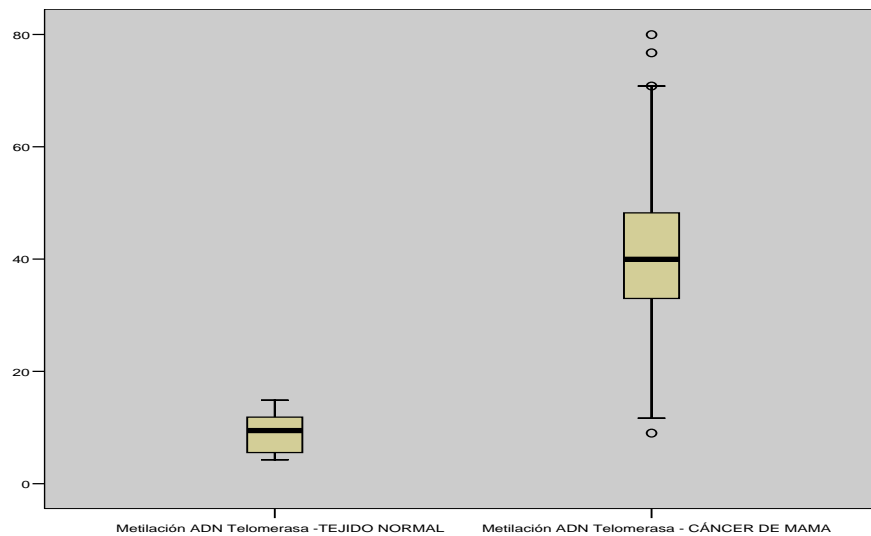


Figura 26. Metilación de telomerasa en tejido mamario normal y cáncer de mama

• CASOS DE CÁNCER DE MAMA INVASIVO

En los casos tumorales la media para los valores de THOR fue de 41,01 (rango 9 - 79,96) (Fig. 27).

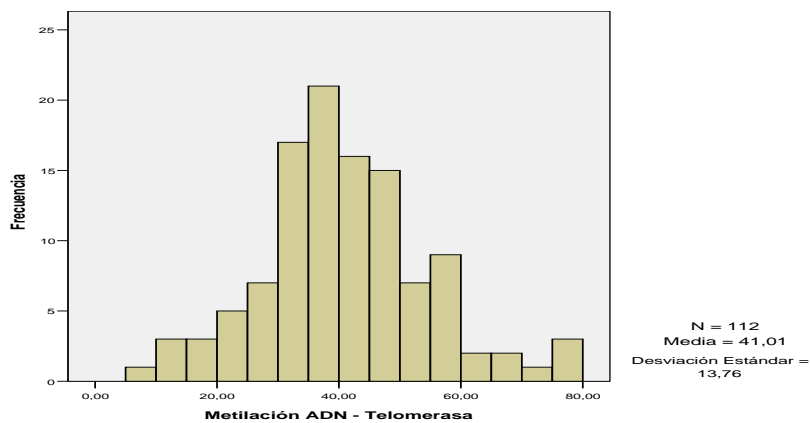


Figura 27. Histograma de valores de THOR

En la distribución de los valores de metilación de la telomerasa, establecimos 2 niveles, considerando un nivel bajo o de hipometilación cuando THOR es $< 20\%$ o $< 40\%$ y un nivel alto o de hipermetilación cuando THOR es $\geq 20\%$ o $\geq 40\%$.

Con umbral de 20%, el 93,75% (105 casos) estaban hipermetilados $>20\%$ (Fig. 28).

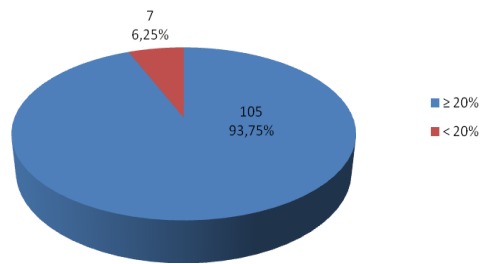


Figura 28. Frecuencia de pacientes según el umbral de 20% de metilación de THOR

Con el umbral de 40% de metilación de la telomerasa el 49,1% (55 casos) se consideraban como hipermetilados y el 50,9% (57 casos) de hipometilados (Fig. 29).

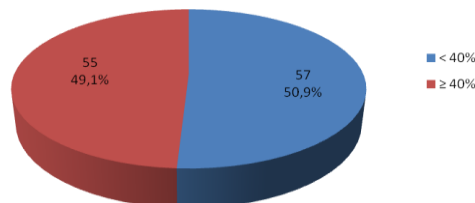


Figura 29. Frecuencia de pacientes según el umbral de 40% de metilación de THOR

➤ EVOLUCIÓN DE LAS PACIENTES

20. RECIDIVA EN ORGANOS (metástasis)

Se ha constatado la ausencia de metástasis en un 80,35% (90 casos). Las metástasis fueron: óseas 5,35% (6 casos), cerebrales 3,57% (4 casos), pulmonares 1,78% (2 casos), hepáticas, supraclaviculares o en la otra mama 0,9% (1 caso) (Fig. 30).

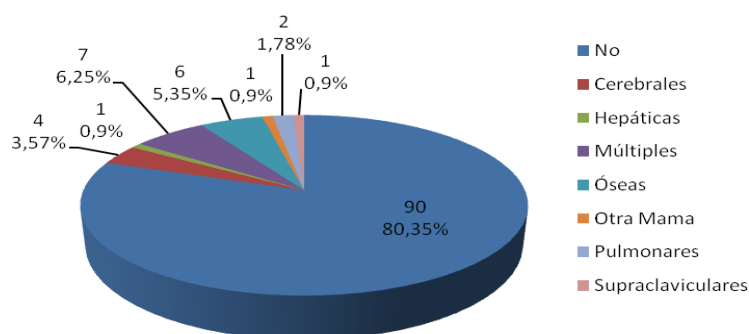


Figura 30. Localización de las metástasis

21. ESTADO DE LAS PACIENTES EN LA ÚLTIMA REVISIÓN

Se registraron 35 muertes (31,25%) y un 68,75% (77 casos) supervivientes, al final de los 12 años de seguimiento (Fig. 31).

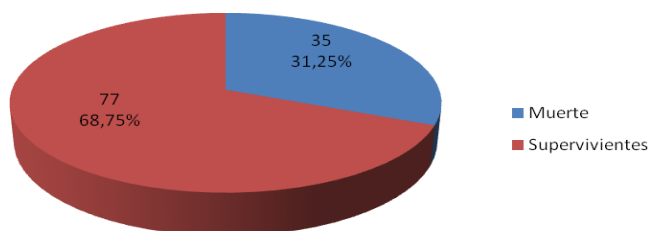


Figura 31. Frecuencia de pacientes vivas y muertas al final del seguimiento

De las pacientes que fallecieron, 18 muertes (16,1%) lo hicieron por la enfermedad y 17 muertes (15,2%) fueron por otras causas. De las pacientes vivas 76 (67,9%) estaban vivas sin enfermedad y sólo 1 (0,9%) de las pacientes está viva con enfermedad (Fig. 32).

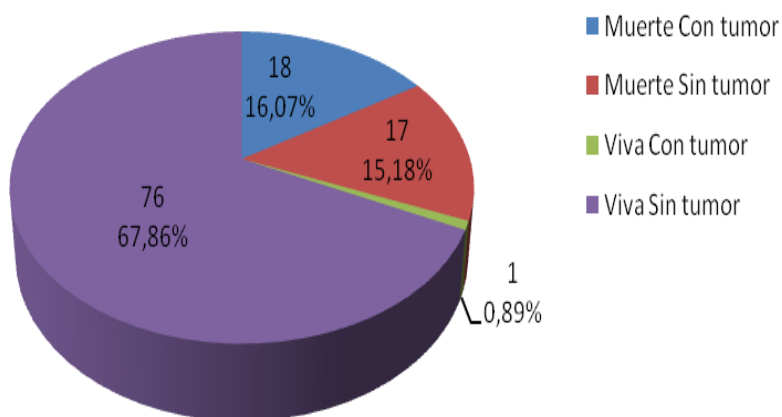


Figura 32. Estado de las pacientes en la última revisión

B. ESTUDIO ANALÍTICO

I. RELACIÓN CON LA PROLIFERACIÓN (KI67)

En el estudio de relación entre el nivel de proliferación celular medido con Ki67, y otros parámetros histopatológicos, se analizaron umbrales del 14%, 20% y 40% (Tabla 1).

Tabla 1. Correlación entre el índice de proliferación Ki67 y características histopatológicas

Ki67	RE	RP	RH	Her2	Subtipo Molecular (LA, LB, HER2, BL)	Subtipo Molecular (Luminal, No-luminal)	Grado (1,2,3)	Grado 1-2 vs 3	Estadio I, II, III	Tipo Histol. Ductal vs No-ductal	Ganglios si/no
Umbral 14 %	,006	,008	,009	,284	,017	,003	,004	,001	,690	,361	,313
Umbral 20 %	,024	,028	,016	,319	,055	,014	,008	,002	,211	,024	,754
Umbral 40%	,000	,015	,001	,044	,002	,000	,000	,000	,223	,126	,932

A continuación, se exponen los resultados estadísticamente significativos obtenidos con el umbral del 40% por ser los más representativos.

1. TAMAÑO DEL TUMOR (≤ 20 mm y > 20 mm)

No se observó relación estadísticamente significativa entre el Ki67 (umbral 40%) y el tamaño tumoral ($p=0,215$) (Fig. 33).

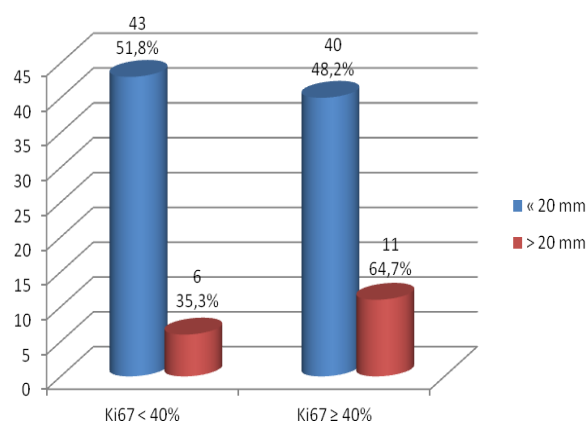


Figura 33. Distribución Ki67 (umbral 40%) vs Tamaño del tumor (≤ 20 mm y > 20 mm)

2. TIPO HISTOLÓGICO (Ductal vs No ductal)

La relación entre Ki67 y tipo histológico (ductal y no ductal) no reveló resultados estadísticamente significativos ($p=0,126$) (Fig. 34).

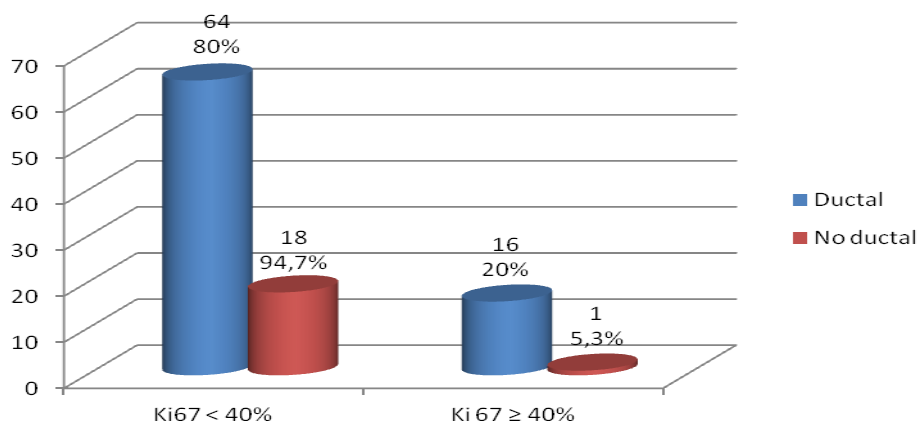


Figura 34: - Distribución Ki67 (umbral 40%) vs Tipo Histológico (ductal y no ductal)

3. GRADO HISTOLÓGICO

Al estudiar la relación entre Ki67 (umbral 40%) y grado histológico, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,000$). Los tumores bien diferenciados (G1) y los moderadamente diferenciados (G2) se encuentran en mayor porcentaje de casos en el grupo con Ki67 < 40% (figs. 35 y 36).

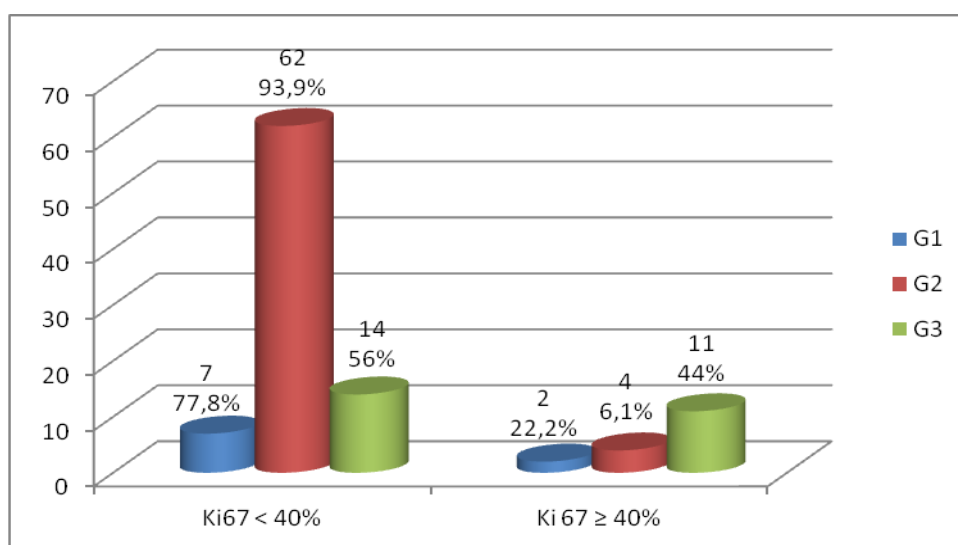


Figura 35. Distribución Ki67 (umbral 40%) vs Grado Histológico

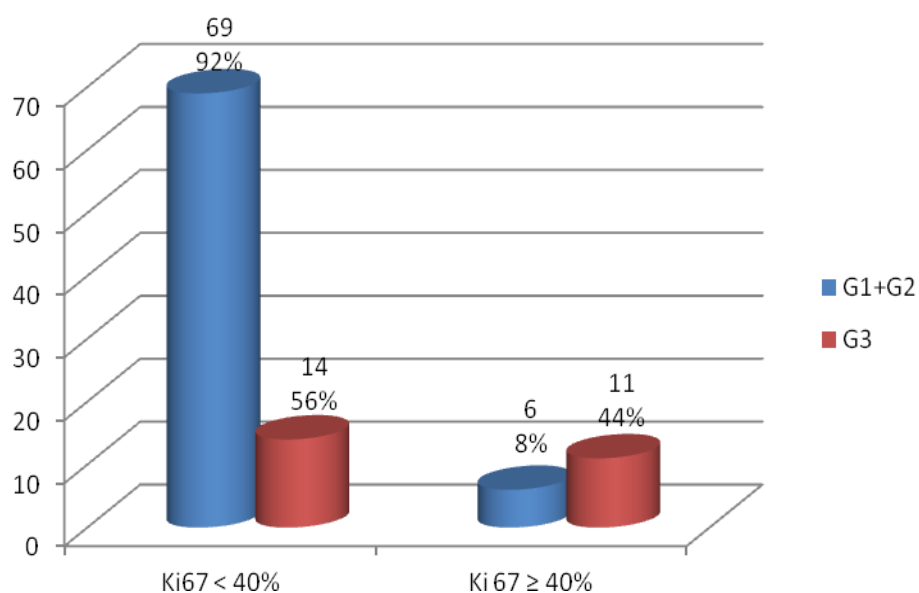


Figura 36. Distribución Ki67 (umbral 40%) vs Grado Histológico (I+II y III)

4. INVASIÓN LINFOVASCULAR

No se observó relación estadísticamente significativa entre el Ki67 con umbral de 40% y la presencia de invasión linfovascular por el tumor ($p=0,470$) (Fig. 37).

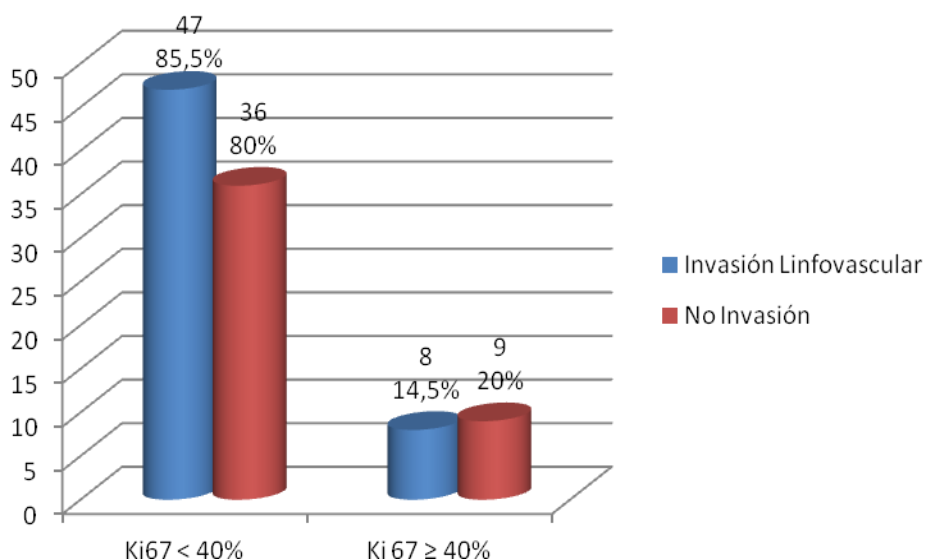


Figura 37: - Distribución Ki67 (umbral 40%) vs Invasión Linfovascular

5. AFECTACIÓN GANGLIONAR

Los resultados entre Ki67 (umbral de 40%) y afectación ganglionar, no fueron estadísticamente significativos ($p=0,932$) (Fig. 38).

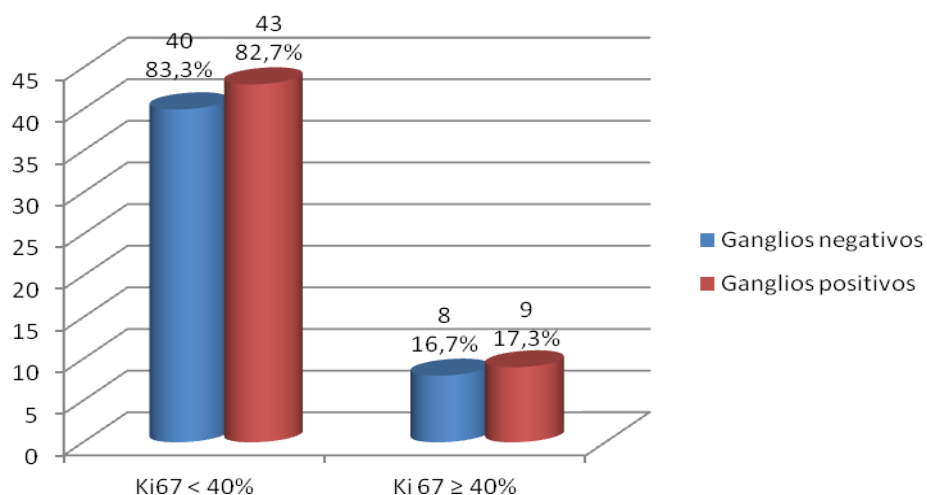


Figura 38. Distribución Ki67 (umbral 40%) vs Afectación Ganglionar

6. RECEPTORES HORMONALES

En la relación entre Ki67 (umbral 40%) y receptores hormonales, hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,001$), con los receptores hormonales positivos en mayor porcentaje en el grupo Ki67 < 40% (Fig. 39).

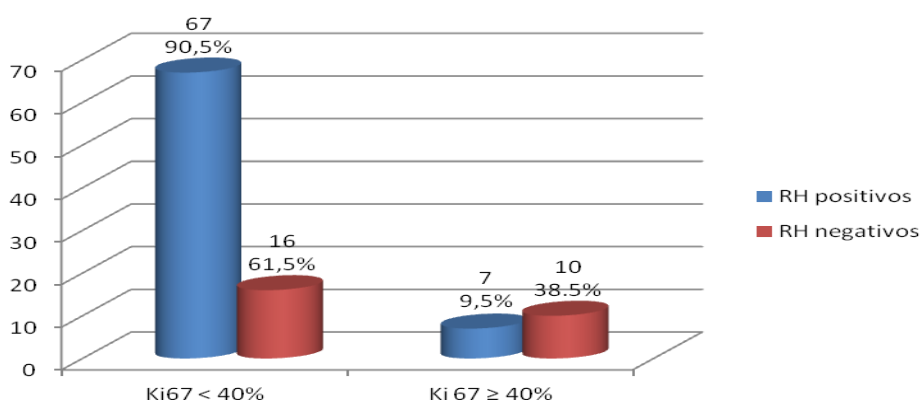


Figura 39. Distribución Ki67 y expresión de Receptores Hormonales

En la relación entre Ki67 (umbral 40%) y receptores de estrógenos, hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,000$), con los receptores de estrógenos positivos en mayor porcentaje en el grupo Ki67 < 40% (Fig. 40).

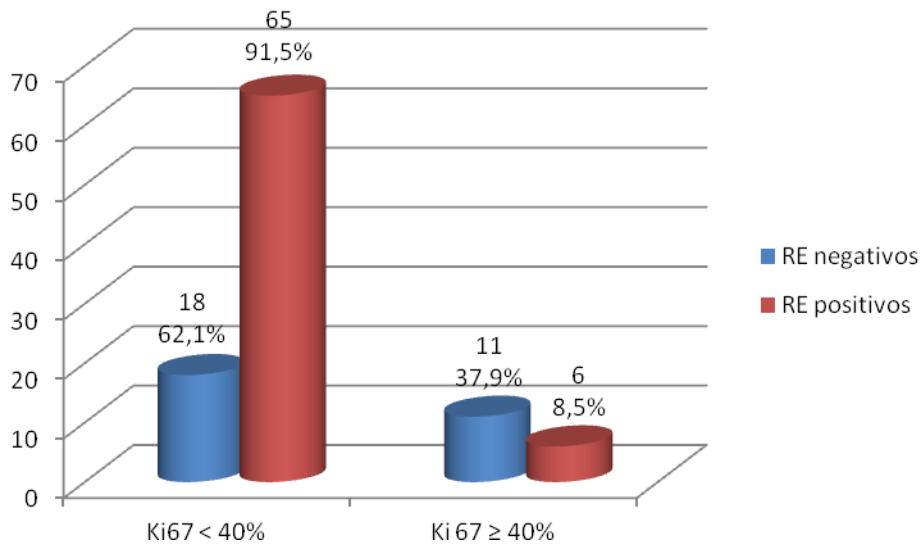


Figura 40. Distribución Ki67 vs expresión de Receptores de Estrógenos

Se registraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,015$) en la relación entre Ki67 (umbral 40%) y los receptores de progesterona, con los receptores de progesterona positivos en mayor porcentaje en el grupo Ki67 < 40% (Fig. 41).

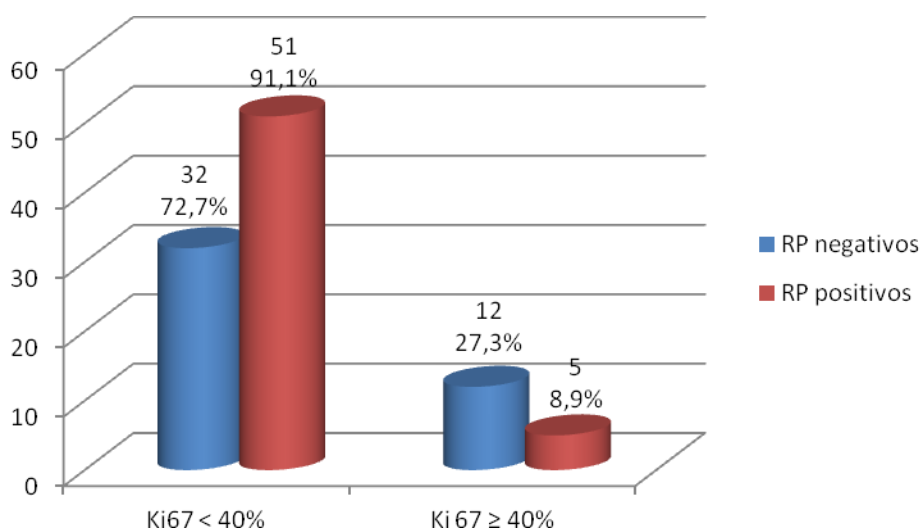


Figura 41. Distribución Ki67 vs Receptores de Progesterona

7. HER2

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,044$) en la relación entre Ki67 (umbral 40%) y Her2 del tumor. Los casos con Her2 negativos se encuentran en mayor porcentaje en el grupo con Ki67 < 40% (Fig. 42).

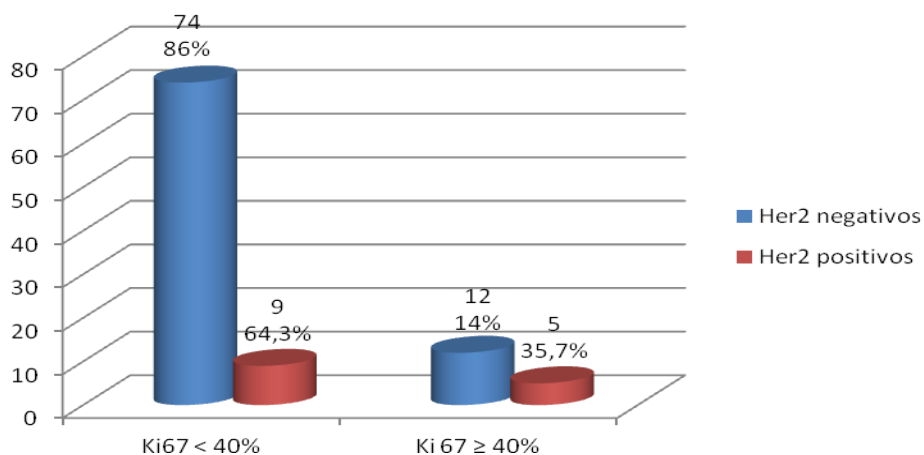


Figura 42. Distribución Ki67 vs Her2

8. ESTADIO

Los resultados obtenidos entre la relación del Ki67 con umbral de 40% y el estadio clínico, no fueron estadísticamente significativos ($p=0,223$) (Fig. 43).

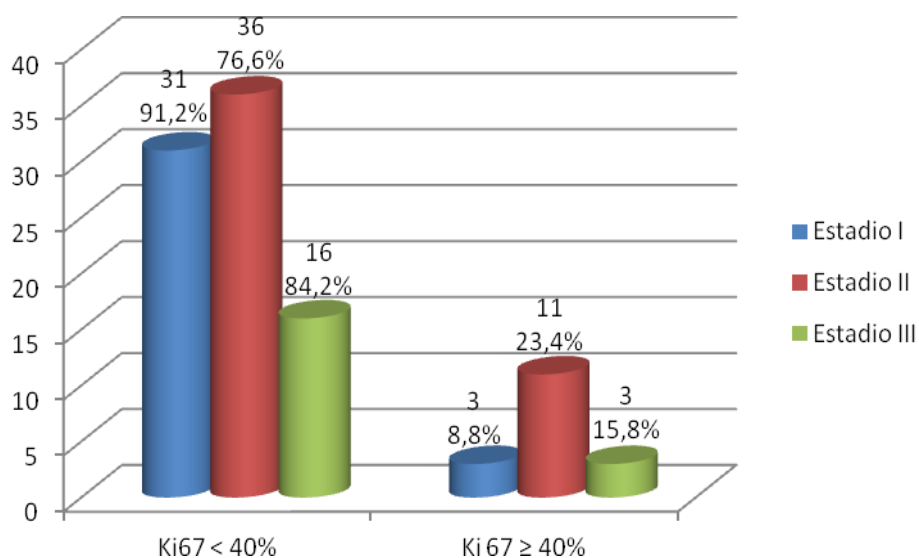


Figura 43. Distribución Ki67 vs Estadio

9. SUBTIPO MOLECULAR SUBROGADO IHQ

En la relación del Ki67 (umbral de 40%) y subtipo molecular inmunohistoquímico, obtuvimos resultados con valores significativos haciendo la distribución de todos en separado (luminal A, luminal B, HER2 y “*basal like*”) ($p=0,02$) y agrupados en 2 grupos (luminal y “no luminal”) ($p=0,000$). Los tumores del grupo luminal, se encuentran en mayor porcentaje de casos en el grupo con $Ki67 < 40\%$ (figs. 44 y 45).

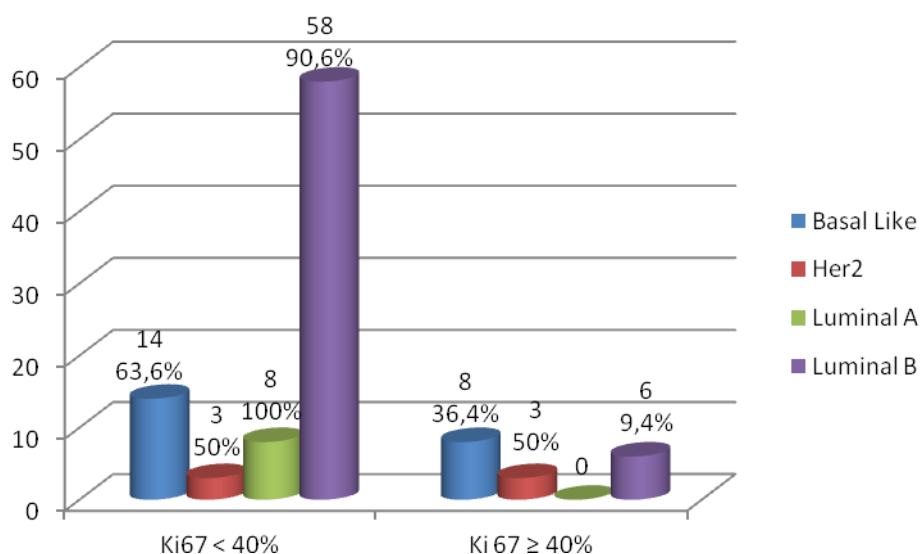


Figura 44. Distribución Ki67 (umbral 40%) vs Subtipo IHQ

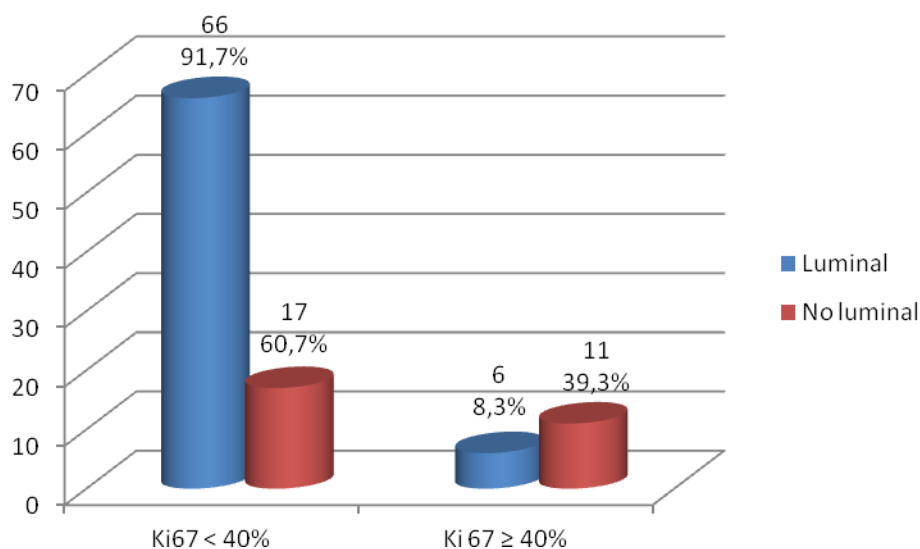


Figura 45. Distribución Ki67 (umbral 40%) vs Subtipo IHQ (Luminal y No luminal)

II. ESTUDIO ANALÍTICO DE RELACIÓN CON TELOMERASA

Se consideró únicamente el umbral de 40% por tener una distribución más homogénea entre las pacientes.

1. TAMAÑO TUMORAL

Cuando dividimos las pacientes dependiendo del valor de THOR con umbral de 40%, no se observaron diferencias significativas en tumores de menos de 2 cm y aquellas con más de 2 cm. ($p=0,183$) (Fig. 46).

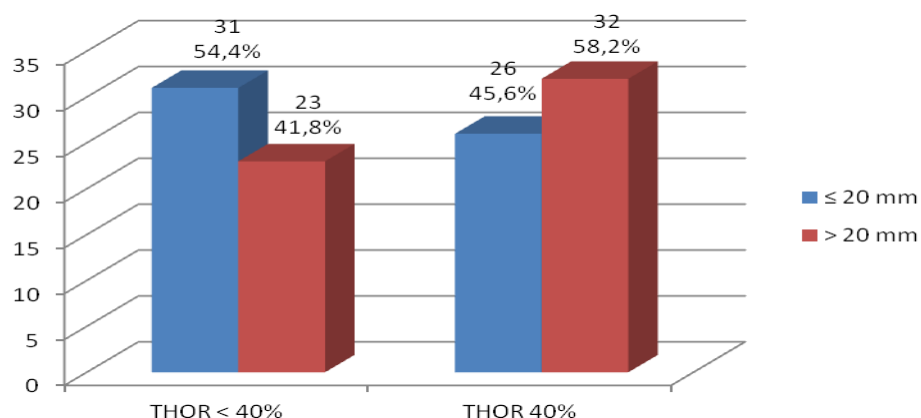


Figura 46. Distribución THOR (umbral 40%) vs Tamaño del tumor (≤ 20mm y > 20mm)

2. TIPO HISTOLÓGICO

La distribución de THOR con umbral de 40% en tumores ductal y no ductal no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,672$) (Fig. 47).

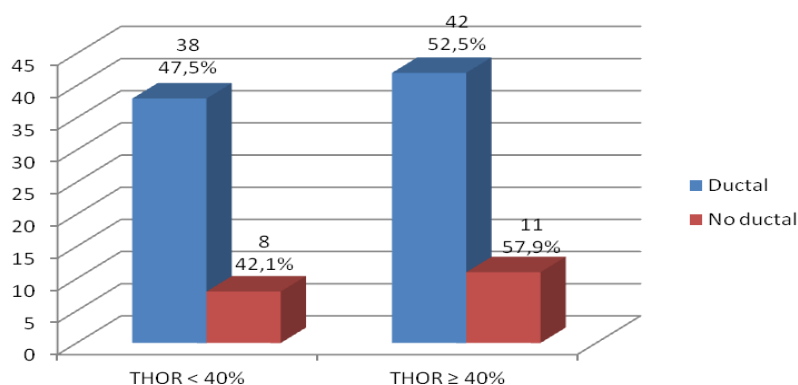


Figura 47. Distribución THOR (umbral 40%) vs Tipo Histológico (ductal y no ductal)

3. GRADO HISTOLÓGICO

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre THOR (umbral 40%) y grado histológico. La distribución queda representada en la figura 48 ($p=0,203$) y figura 49 ($p=0,298$).

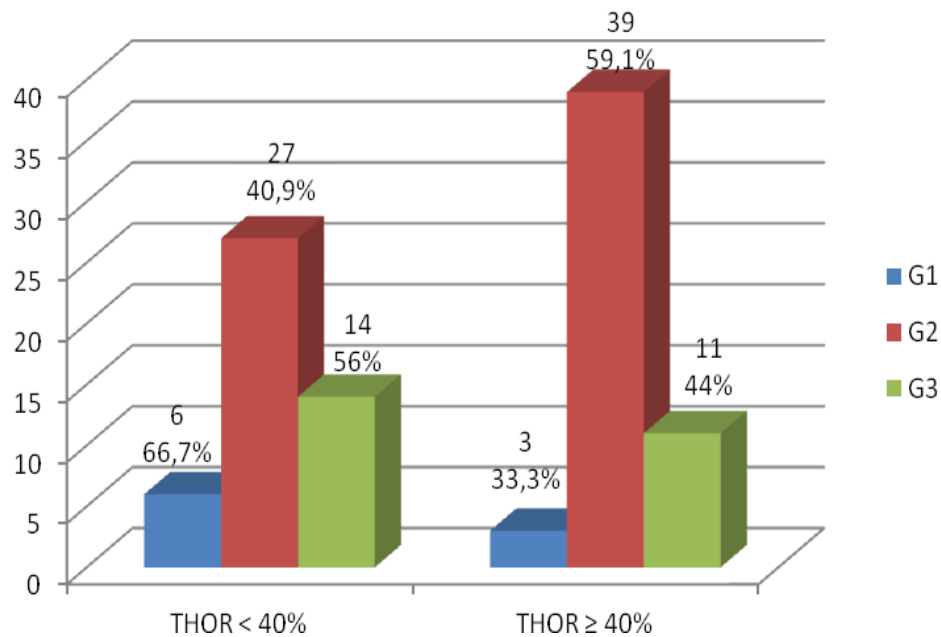


Figura 48. Distribución THOR (umbral 40%) vs Grado Histológico (I, II y III)

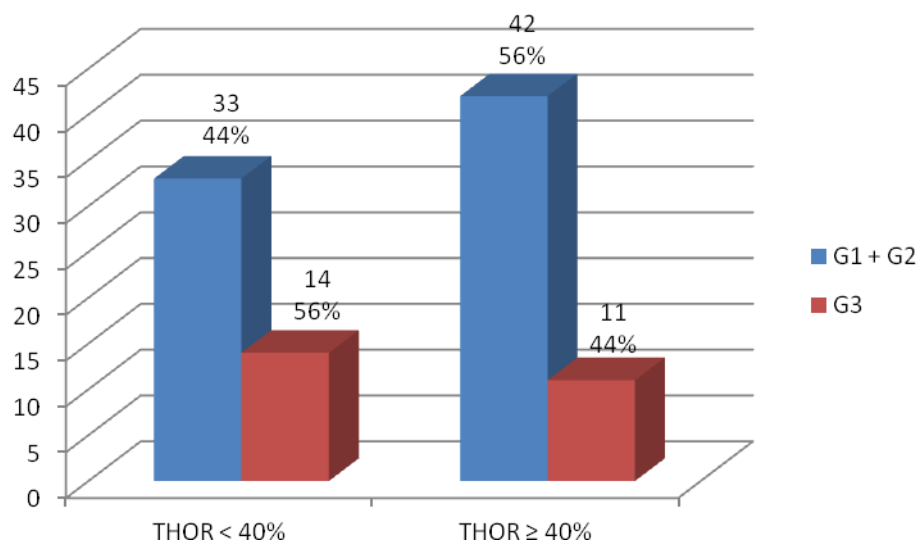


Figura 49. Distribución THOR (umbral 40%) vs Grado Histológico (I + II y III)

4. INVASIÓN LINFOVASCULAR

No se observó relación estadísticamente significativa entre THOR con umbral de 40% y invasión linfovascular por el tumor ($p=0,952$) (Fig. 50).

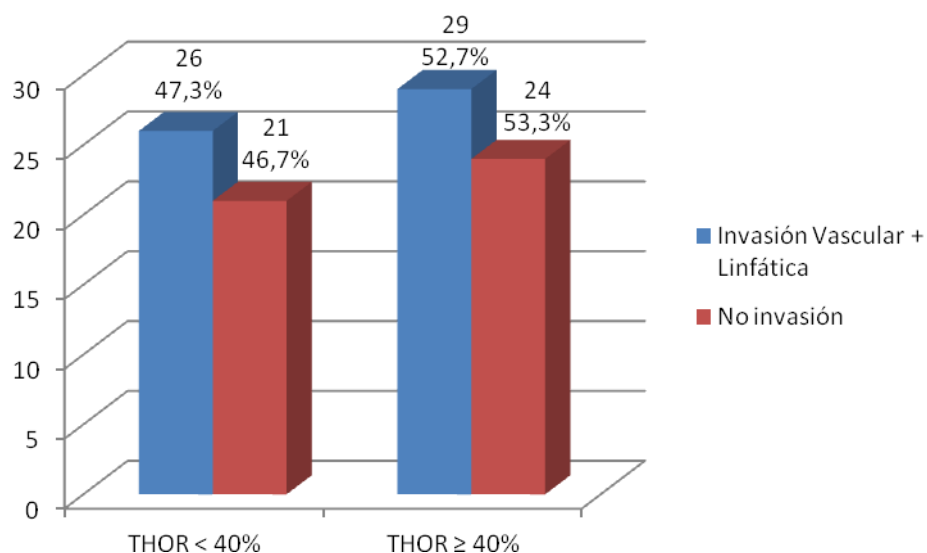


Figura 50. Distribución THOR (umbral 40%) vs Invasión Linfovascular

5. AFECTACIÓN GANGLIONAR

Tampoco se observó relación estadísticamente significativa entre el THOR con umbral de 40% y la afectación ganglionar ($p=0,992$) (Fig. 51).

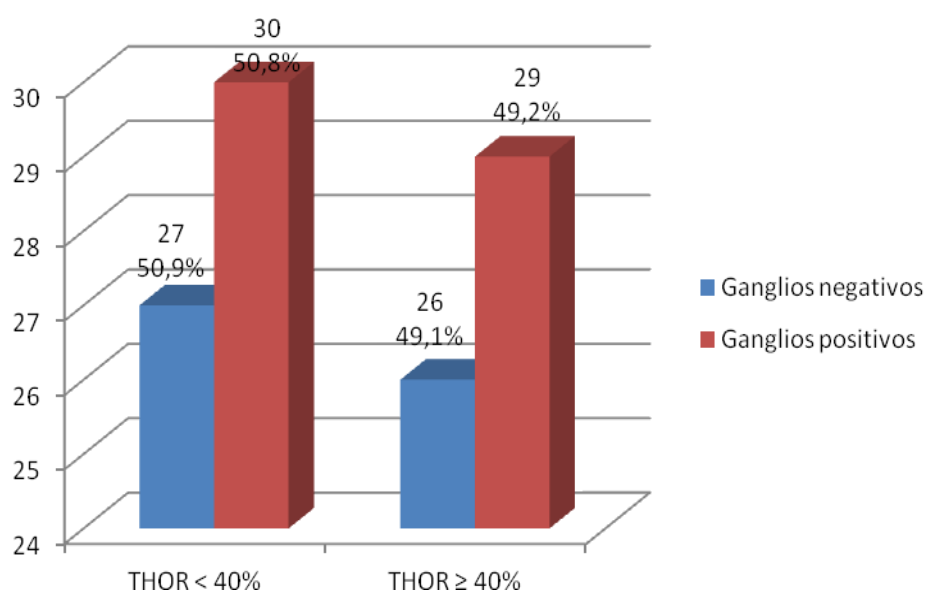


Figura 51. Distribución THOR (umbral 40%) vs Afectación Ganglionar

6. RECEPTORES HORMONALES (RE/RP)

Se observó una distribución semejante en pacientes con RH positivos y negativos en THOR con umbral de 40% ($p=0,577$) (Fig. 52).

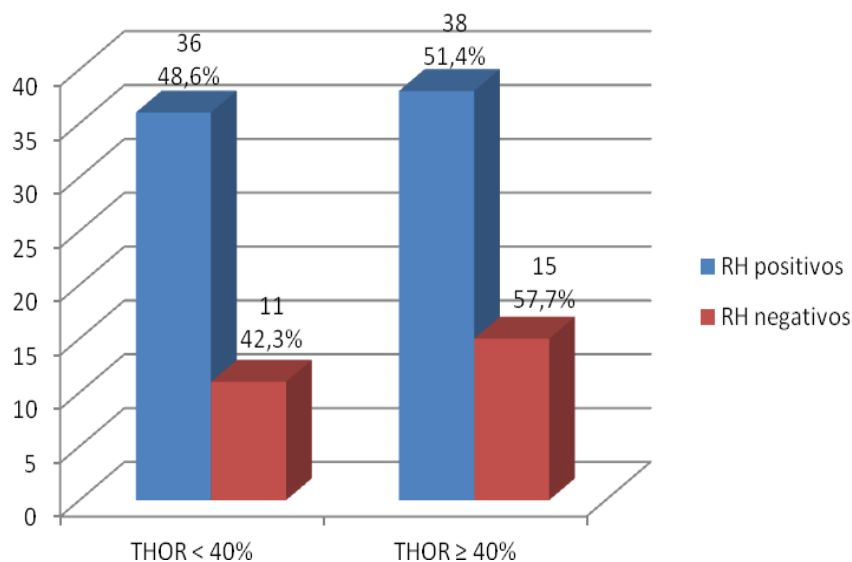


Figura 52. Distribución THOR (umbral 40%) vs RH

Esta relación se mantuvo cuando se valoraron de manera independiente RE ($p=0,870$) (Fig. 53) y RP ($p=0,594$) (Fig. 54).

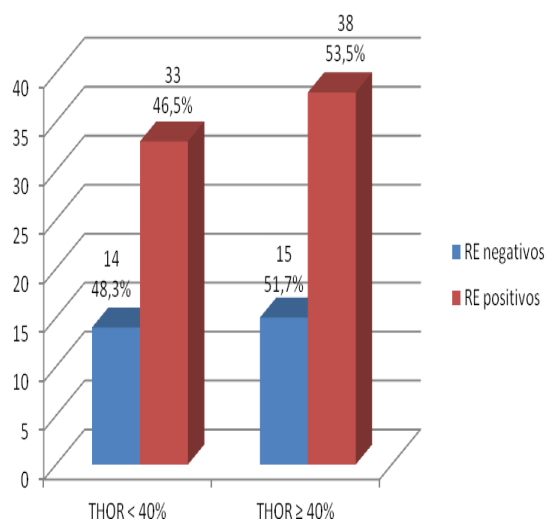


Figura 53. Distribución THOR vs RE

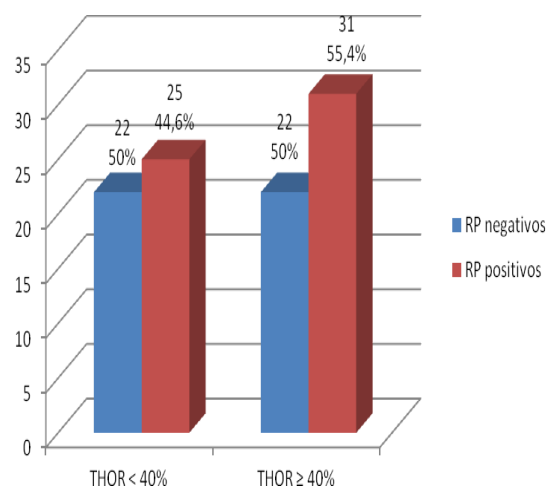


Figura 54. Distribución THOR vs RP

7. HER2

En la relación entre THOR (umbral 40%) y Her2, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,162$) (Fig. 55)

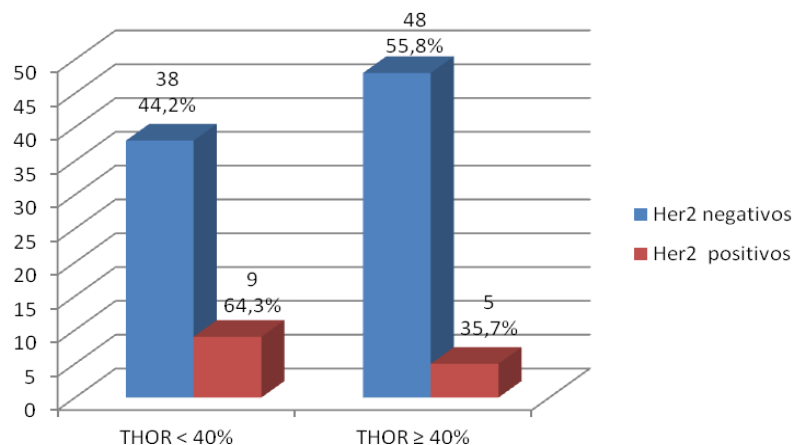


Figura 55. Distribución THOR (umbral 40%) vs Her2

8. ESTADIO

Los estadios iniciales fueron más frecuentes en el grupo con THOR < 40%, siendo los estadios avanzados más frecuentes en el grupo con THOR ≥ 40% ($p=0,682$) (Fig. 56).

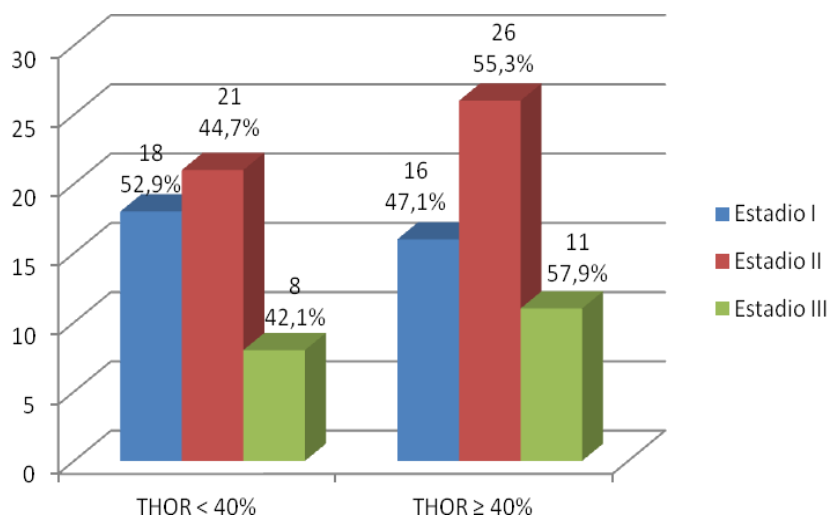


Figura 56. Distribución THOR (umbral 40%) vs Estadio (I, II, III)

9. SUBTIPO MOLECULAR SUBROGADO IHQ

El subtipo molecular inmunohistoquímico, más frecuente en aquellos tumores con niveles bajos de metilación fueron luminal A y HER2 mientras que los “*basal like*” y luminal B fueron más habituales en tumores hipermetilados ($p=0,995$) (Fig. 57).

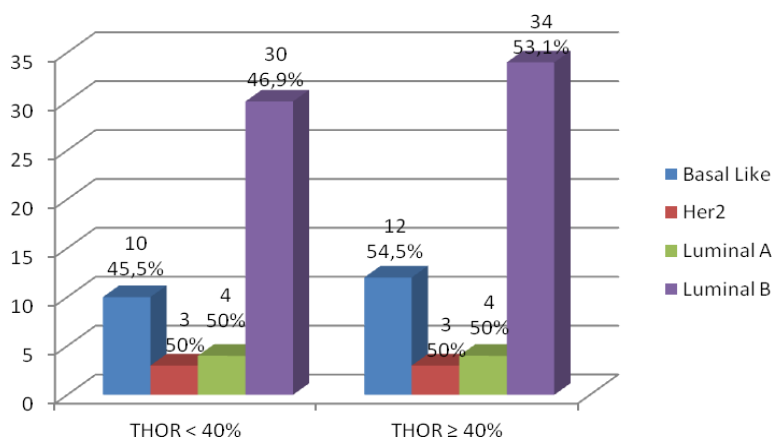


Figura 57. Distribución THOR (umbral 40%) vs Subtipos Moleculares IHQ

III. ESTUDIO ANALÍTICO DE RELACIÓN TELOMERASA vs KI67

1. TELOMERASA (umbral 40%) vs KI67 (umbral 14%)

No se observaron diferencias en el nivel de expresión de Ki67 tomando como referencia el 14% en pacientes hipo e hipermetilados ($p=0,990$) (Fig. 58).

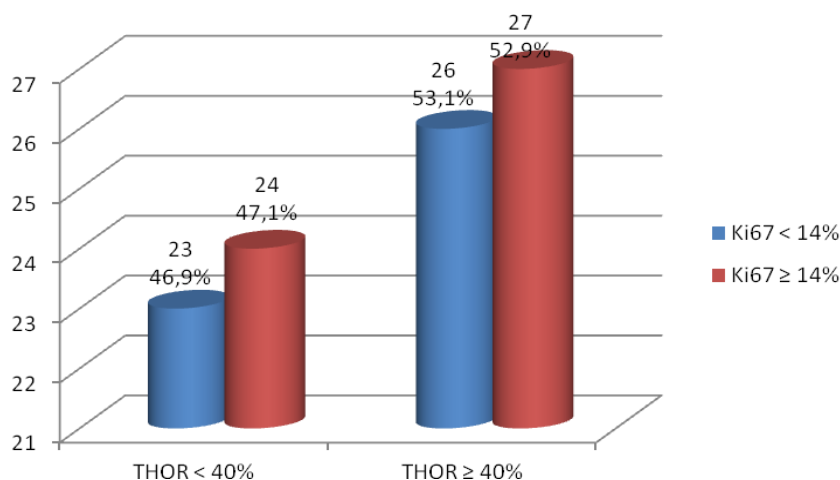


Figura 58. Distribución THOR (umbral 40%) vs KI67 (umbral 14%)

2. TELOMERASA (umbral 40%) vs KI67 (umbral 20%)

Tomando como umbral el 20% del índice de proliferación, observamos que existe una frecuencia mayor de tumores con elevada proliferación en el grupo de pacientes con hipermetilación ($p=0,443$) (Fig. 59).

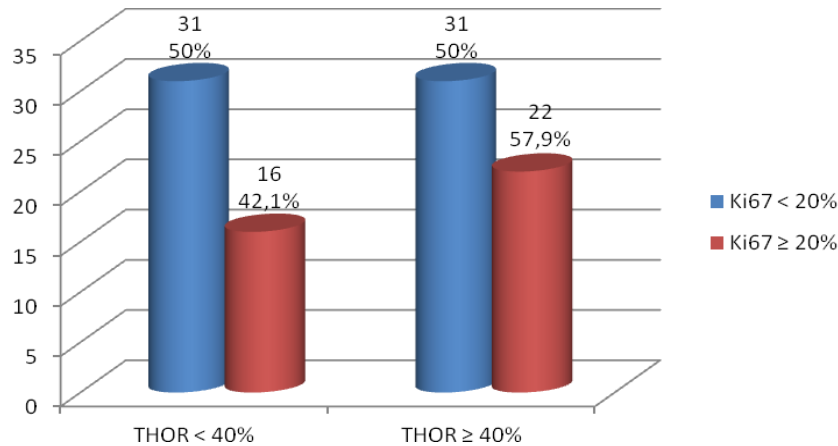


Figura59. Distribución THOR (umbral 40%) vs KI67 (umbral 20%)

3. TELOMERASA (umbral 40%) vs KI67 (umbral 40%)

Cuando se modifica el umbral de Ki67 a 40%, se observó que los tumores con mayor índice de proliferación muestran tendencia a asociarse a bajas tasas de metilación ($p=0,284$) (Fig. 60).

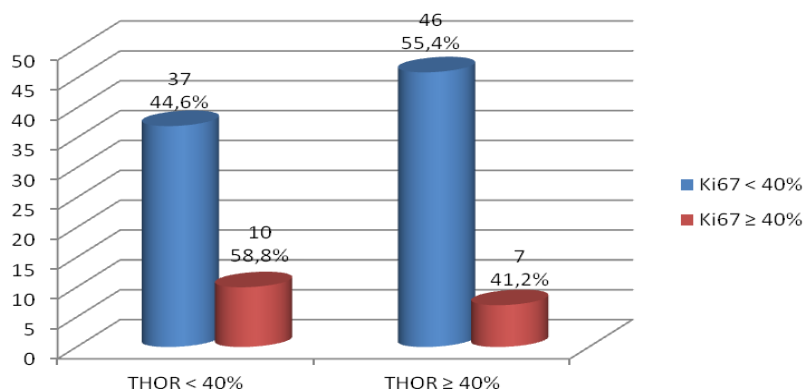


Figura 60. Distribución THOR (umbral 40%) vs KI67 (umbral 40%)

C. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

➤ SUPERVIVENCIA GLOBAL DE LA POBLACIÓN

De los 112 pacientes del estudio, sobrevivieron 68,8% (77 casos) y la supervivencia global media en las pacientes de nuestro estudio fue de 115,4 meses (+/- 4,9) (Fig. 61).

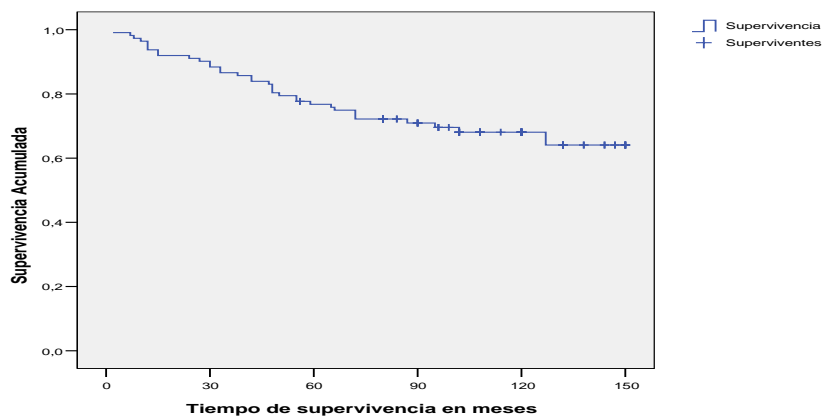


Figura 61. Supervivencia Global (meses)

1. TAMAÑO DEL TUMOR (cm)

En nuestro estudio, 54 casos tenían tumores de ≤ 2 cm y supervivencia global media de 72,2%. En el grupo de 58 casos con tumores > 2 cm de tamaño hubo 38 supervivientes (65,5%). Aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística ($p=0,397$), la supervivencia global media en pacientes con tumor ≤ 2 cm fue de 120,3 meses (+/- 6,6), mientras que en los casos con tumor > 2 cm fue de 110,9 meses (+/- 7,2) (Fig. 62).

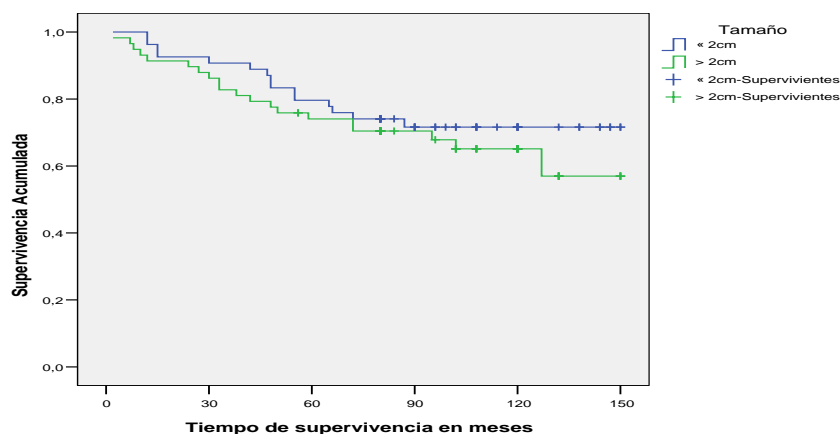


Figura 62. Supervivencia Global y Tamaño del tumor ($p=0,397$)

2. GRADO HISTOLÓGICO

Se registraron 11 casos grado 1 con 10 supervivientes (90,9%), 75 casos grado 2 con 49 supervivientes (65,3%) y 26 casos grado 3 con 18 supervivientes (69,2%). La supervivencia media con grado 1 fue 99,2 meses (+/- 2,6), con grado 2 fue 112,4 meses (+/- 6,1), y con grado 3 fue 111,2 meses (+/- 10,6). No hubo diferencias estadísticas significativas ($p=0,407$). Cuando reagrupamos tumores (G1) y (G2+G3) aunque no se alcanzó significación estadística ($p=0,135$), en 11 casos grado 1 la supervivencia global media fue 90,9% y en 101 casos grado 2 y 3 la supervivencia global media fue 66,3%.

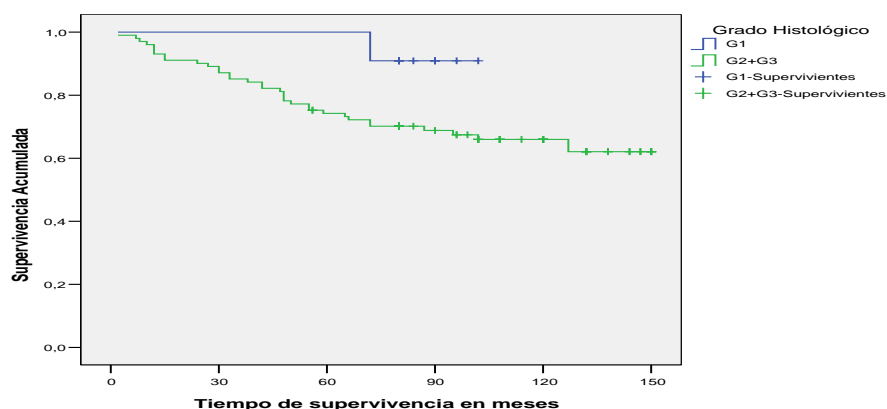


Fig 63. Supervivencia Global (meses) y Grado Histológico (G1 y G2+G3) ($p=0,135$)

3. INVASIÓN LINFOVASCULAR

La supervivencia global media en pacientes sin invasión linfovascular fue 120,2 meses (+/- 6,9), y con invasión linfovascular fue 111,8 meses (+/- 6,9) ($p=0,371$) (Fig. 64).

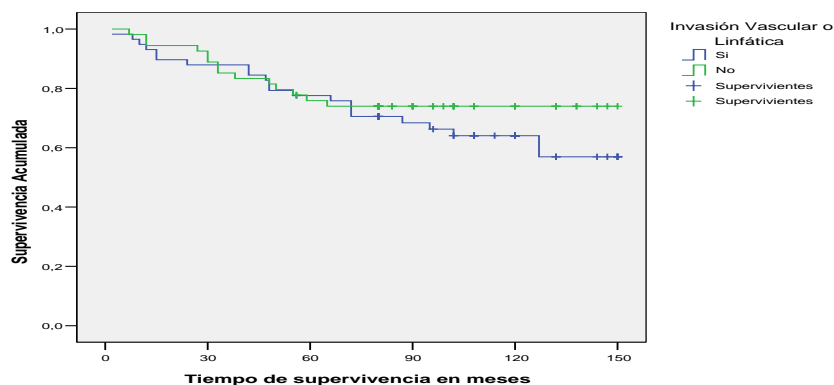


Figura 64. Supervivencia Global e Invasión Vascular o Linfática ($p=0,371$)

4. AFECTACIÓN GANGLIONAR

Se registraron 53 casos sin afectación ganglionar con 41 supervivientes (77,4%) y en los 59 casos con afectación ganglionar hubo 36 supervivientes (61%). La supervivencia global media en pacientes con ganglios negativos fue 125,2 meses (+/- 6,4), y con ganglios positivos fue 105,7 meses (+/- 7,3). Las diferencias estadísticas se encuentran cerca del límite de significancia en las curvas de supervivencia ($p=0,055$) (Fig. 65).

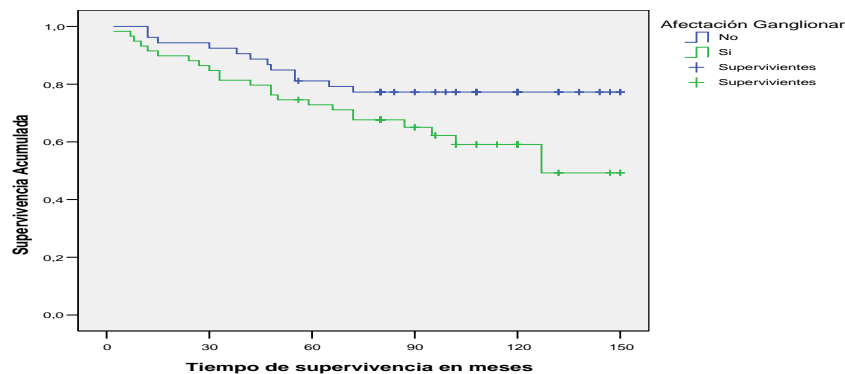


Figura 65. Supervivencia Global (meses) y Afectación Ganglionar ($p=0,055$)

5. RECEPTORES HORMONALES

En 28 casos receptores hormonales negativos, hubo 15 supervivientes (53,6%) y en los 84 casos receptores hormonales positivos hubo 62 supervivientes (73,8%). La supervivencia global media en pacientes con receptores hormonales negativos fue 96,7 meses (+/-10,6) y con receptores positivos fue 121,6 meses (+/-5,3) ($p=0,039$) (Fig. 66).

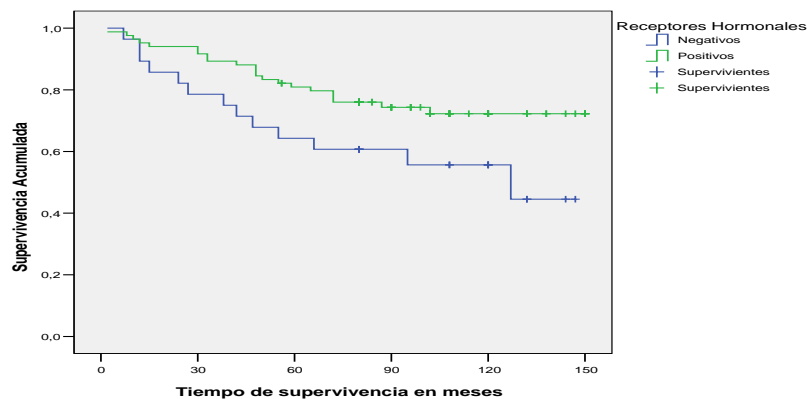


Figura 66. Supervivencia Global y RH (RE/RP Positivos/Negativos) ($p=0,039$)

➤ RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

En 30 casos con receptores de estrógenos negativos hubo 17 supervivientes (56,7%) y 82 casos de receptores positivos con 60 supervivientes (73,2%). La supervivencia global media con receptores de estrógenos negativos fue de 99,8 meses (+/- 10,1), y con receptores positivos fue de 120,9 meses (+/- 5,4) ($p=0,090$) (Fig.67)

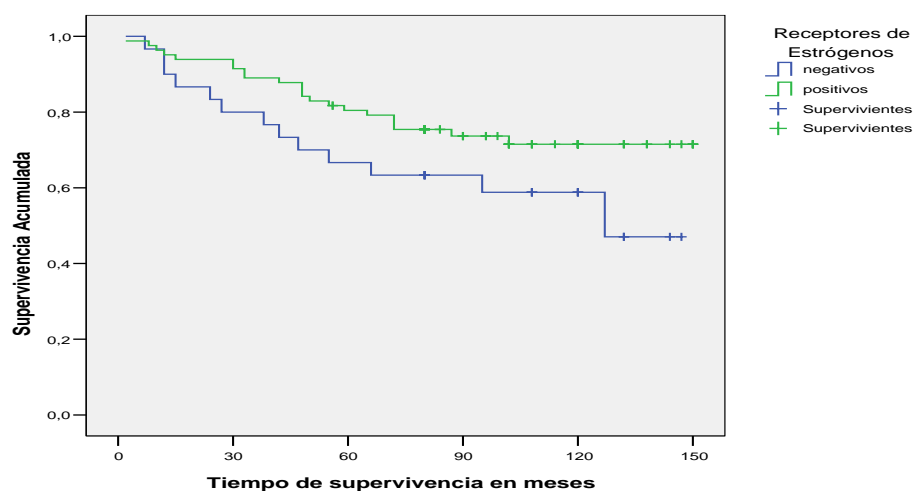


Figura 67. Supervivencia Global (meses) y Receptores de Estrógenos ($p=0,090$)

➤ RECEPTORES DE PROGESTERONA

En los 46 casos con receptores de progesterona negativos hubo 23 supervivientes (50%) y 66 casos receptores positivos con 54 supervivientes (81,8%). La supervivencia global media con receptores de progesterona negativos fue de 91,1 meses (+/- 8,4), y con receptores positivos fue de 131,6 meses (+/- 4,9), ($p=0,000$) (Fig. 68)

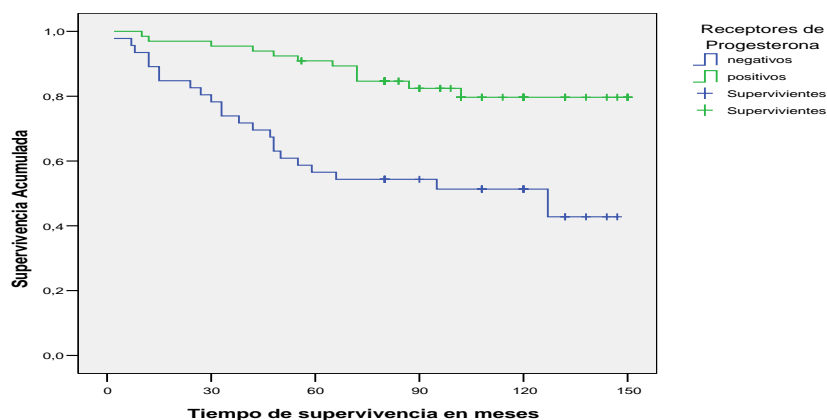


Figura 68. Supervivencia Global (meses) y Receptores de Progesterona ($p=0,000$)

6. HER2

En nuestro estudio, la supervivencia global media en pacientes con Her2 negativos fue de 115,7 meses (+/- 5,3) y con Her2 positivos fue de 110,3 meses (+/- 12,8). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia ($p=0,889$)

7. Ki67

➤ Ki67 (umbral 14%)

La supervivencia global media en pacientes Ki67 < 14% fue de 116,4 meses (+/- 7,0) y en los casos con Ki67 \geq 14% fue de 111,1 meses (+/- 7,8) ($p=0,785$) (Fig. 69).

➤ Ki67 (umbral 20%)

Cuando se reagrupan, la supervivencia global media en pacientes con Ki67 < 20% fue 111,3 meses (+/- 6,7) y con Ki67 \geq 20% fue 117,3 meses (+/- 8,5) ($p=0,404$) (Fig. 70).

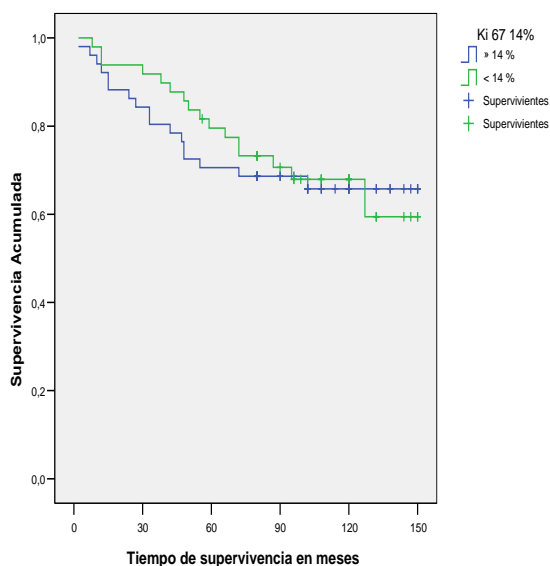


Figura 69. Supervivencia Global y Ki67 (14%)
($p=0,785$)

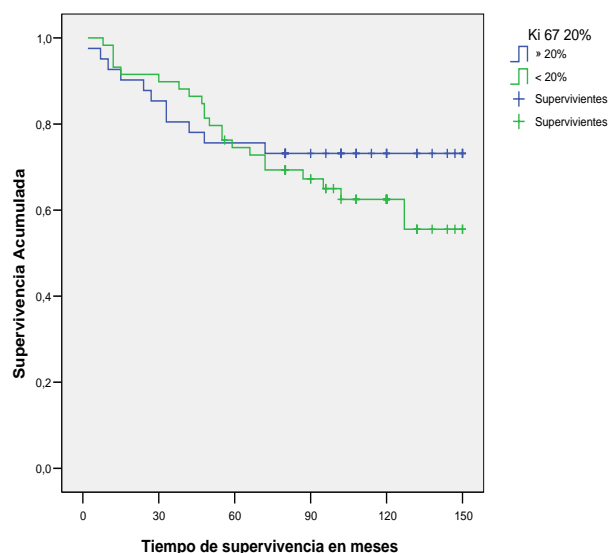


Figura 70. Supervivencia Global y Ki67 (20%)
($p=0,404$)

➤ Ki67 (umbral 40%)

En nuestro estudio, cuando agrupamos los casos según el índice de proliferación Ki67 < 40% la supervivencia global media fue de 111,1 meses (+/- 5,8), mientras que en los casos con Ki67 \geq 40% fue de 125,2 meses (+/- 11,3). ($p=0,205$) (Fig. 71).

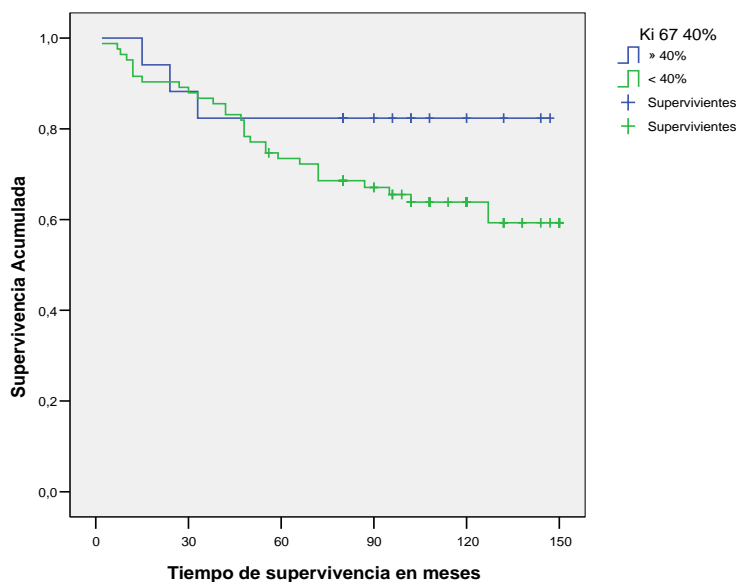


Figura 71. Supervivencia Global (meses) y Ki67 (40%) ($p=0,205$)

Cuando realizamos una selección de casos según las pacientes tengan ganglios negativos o positivos observamos que:

➤ Ki67 (umbral 14%) en grupo de GANGLIOS NEGATIVOS

En los 48 casos de ganglios negativos hubo 20 casos con Ki67 < 14% siendo 14 supervivientes (70%) y 28 casos con Ki67 \geq 14% siendo 23 supervivientes (82,1%). La supervivencia global media en pacientes con ganglios negativos y Ki67 < 14% fue de 117,1 meses (+/- 11,4), mientras que en los casos con ganglios negativos y Ki67 \geq 14% fue de 129,5 meses (+/- 8,4). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia ($p=0,330$).

➤ Ki67 (umbral 20%) en grupo de GLANGLIOS NEGATIVOS

En los 48 casos de ganglios negativos hubo 28 casos con Ki67 < 20% siendo 18 supervivientes (64,3%) y 20 casos con Ki67 \geq 20% siendo 19 supervivientes (95%). La supervivencia global media en las pacientes con ganglios negativos y con el Ki67 < 20% fue de 110,9 meses (+/- 10,0), mientras que en los casos con ganglios negativos y con el Ki67 \geq 20% fue de 143,2 meses (+/- 6,5). Hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia ($p=0,016$) (Fig. 72).

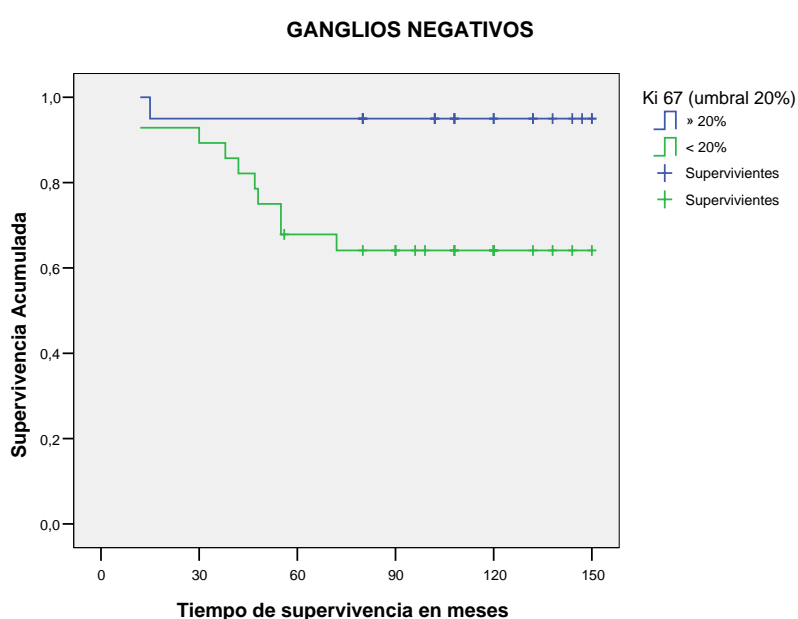


Figura 72. Ganglios Negativos: Supervivencia Global (meses) y Ki 67 (umbral 20%) ($p=0,016$)

➤ Ki67 (umbral 40%) en grupo de GLANGLIOS NEGATIVOS

Se registraron en los 48 casos de ganglios negativos 40 casos con Ki67 < 40% siendo 30 supervivientes (75%) y 8 casos con Ki67 \geq 40% siendo 7 supervivientes (87,5%). La supervivencia global media en las pacientes con ganglios negativos y con el Ki67 < 40% fue de 122,7 meses (+/- 7,6), mientras que en los casos con ganglios negativos y con el Ki67 \geq 40% fue de 130,5 meses (+/- 15,4). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia ($p=0,487$).

➤ Ki67 (umbral 14%) en grupo de GANGLIOS POSITIVOS

En los 52 casos de ganglios positivos hubo 29 casos con Ki67 < 14% siendo 19 supervivientes (65,5%) y 23 casos con Ki67 \geq 14% siendo 11 supervivientes (47,8%). La supervivencia global media en las pacientes con ganglios positivos y con el Ki67 < 14% fue de 116,0 meses (+/- 8,8), mientras que en los casos con ganglios positivos y con el Ki67 \geq 14% fue de 87,6 meses (+/- 12,7). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia ($p=0,079$) (Fig. 73).

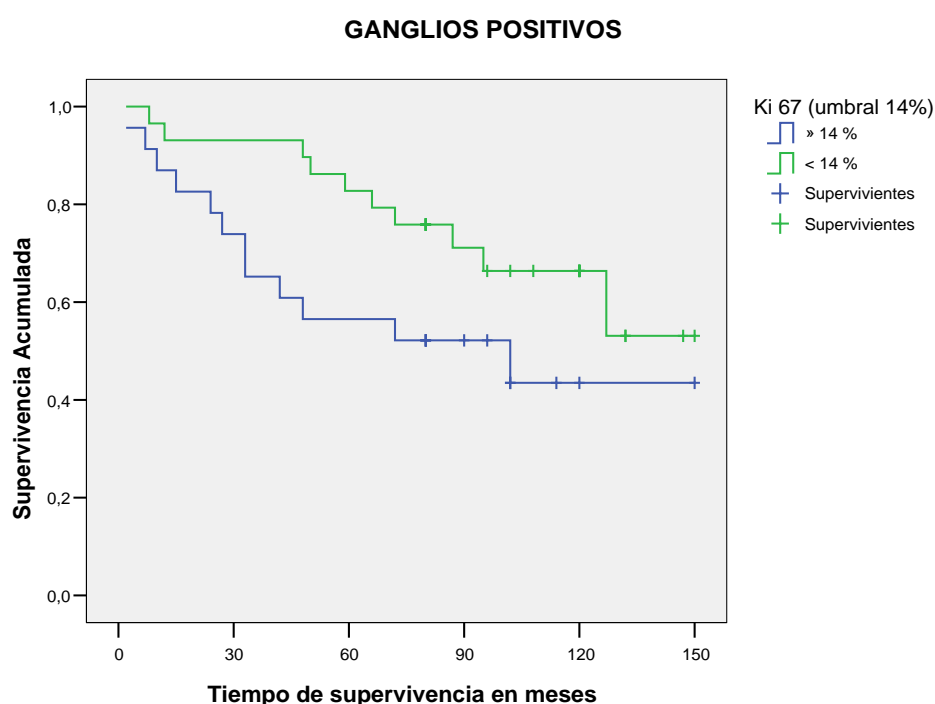


Figura 73. Ganglios positivos: Supervivencia Global (meses) y Ki67 (umbral 14%) ($p=0,079$)

➤ Ki67 (umbral 20%) en grupo de GANGLIOS POSITIVOS

La supervivencia global media en las pacientes con ganglios positivos y con el Ki67 < 20% fue de 111,7 meses (+/- 8,9), mientras que en los casos con ganglios positivos y con el Ki67 \geq 20% fue de 92,7 meses (+/- 13,4). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia ($p=0,235$).

➤ Ki67 (umbral 40%) en grupo de GANGLIOS POSITIVOS

La supervivencia global media en las pacientes con ganglios positivos y con el Ki67 < 40% fue de 100,1 meses (+/- 8,5), mientras que en los casos con ganglios positivos y con el Ki67 \geq 40% fue de 99,6 meses (+/- 12,7). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia ($p=0,331$).

8. ESTADIO CLÍNICO

La supervivencia global media en las pacientes con tumor Estadio I fue de 120,0 meses (+/- 8,2), en las pacientes con tumor Estadio IIA fue de 128,2 meses (+/- 7,4), en las pacientes con tumor Estadio IIB fue de 97,1 meses (+/- 14,3), mientras que en los casos con tumor Estadio IIIA fue de 95,4 meses (+/- 9,5). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia ($p=0,065$) (Fig.74).

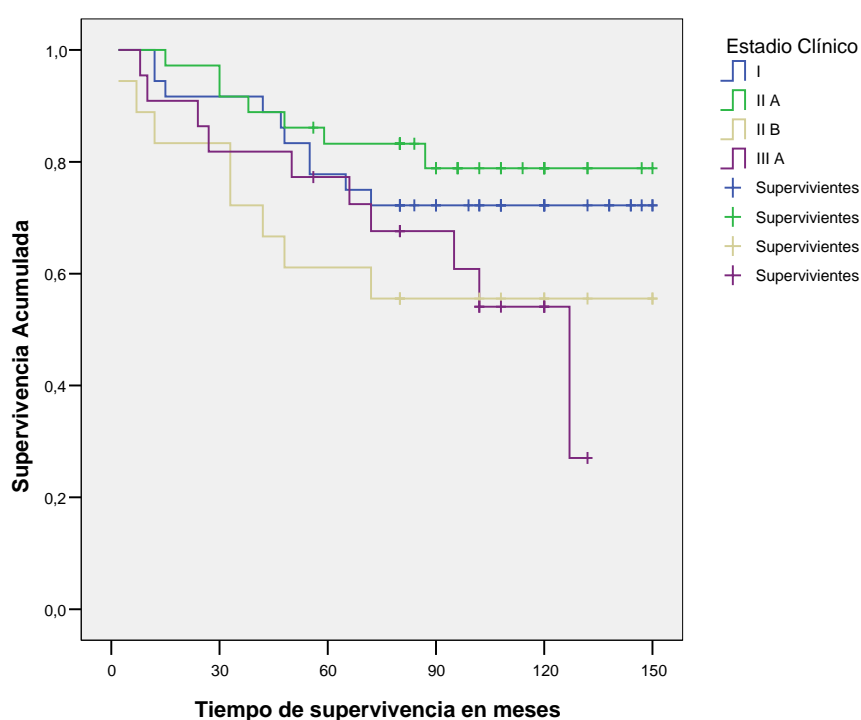


Figura 74. Supervivencia Global (meses) y Estadio Clínico ($p=0,065$)

9. SUBTIPO MOLECULAR SUBROGADO IHQ

La supervivencia global media en pacientes con tumor “Luminal A” fue de 93,6 meses (+/- 2,2), con tumor “Luminal B” fue de 118,8 meses (+/- 5,9), con tumor “HER2” fue de 108,1 meses (+/- 21,8) y con tumor “*Basal Like*” fue de 93,4 meses (+/- 11,9). Hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia ($p=0,015$) (Fig. 75)

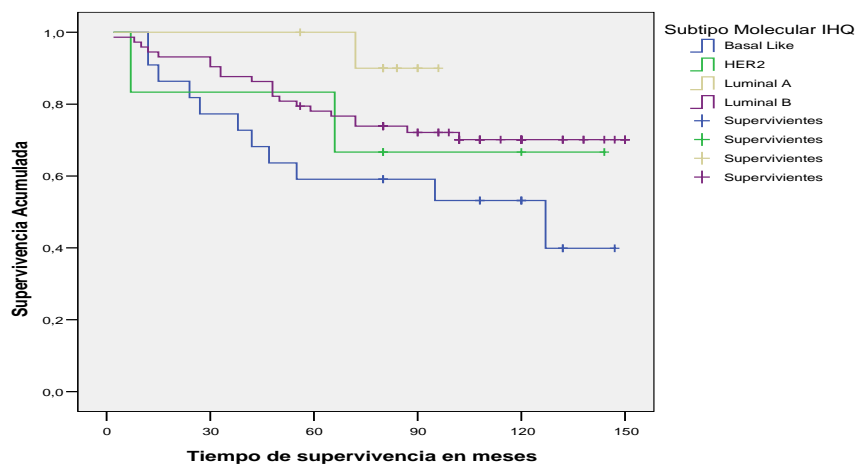


Figura 75. Supervivencia Global (meses) Subtipo Molecular Subrogado IHQ ($p=0,015$)

➤ SUBTIPO MOLECULAR SUBROGADO IHQ (Luminal vs No-luminal)

Agrupando los casos en “Luminales” y “No-luminales”, la supervivencia global media con tumores “Luminal” fue de 121,6 meses (+/- 5,3) y en los tumores “No-luminal” fue de 96,7 meses (+/- 10,6), con diferencias estadísticas significativas ($p=0,039$) (Fig. 76)

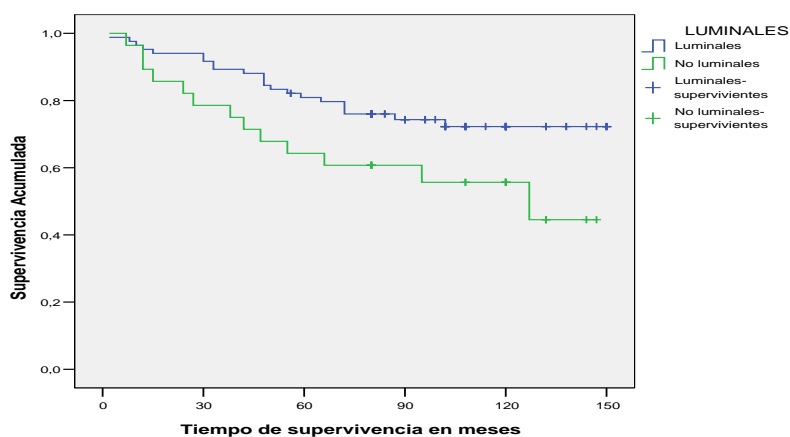


Figura 76. Supervivencia Global (meses) en Luminales/No Luminales ($p=0,039$)

10.TELOMERASA

En 57 casos con THOR < 40% hubo 38 supervivientes (66,7%) y en los 55 casos con THOR \geq 40% hubo 39 supervivientes (70,9%). La supervivencia global media con THOR < 40% fue 109,1 meses (+/- 7,2) y con THOR \geq 40% fue 120,8 meses (+/- 6,3). Curvas de supervivencia sin diferencias estadísticas significativas ($p=0,389$) (Fig. 77)

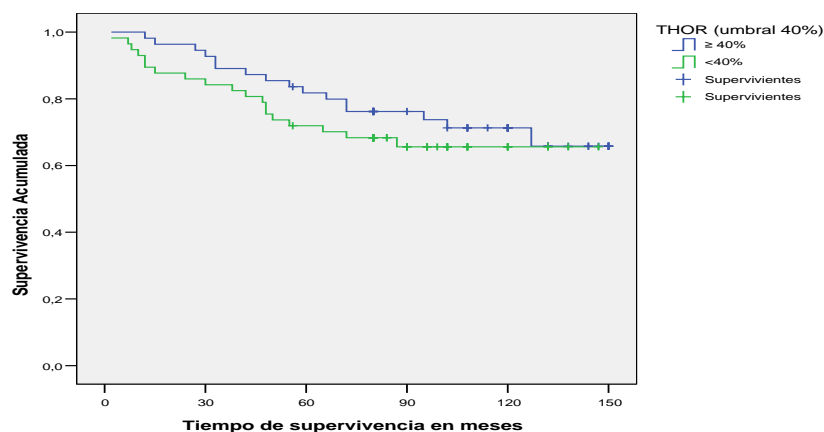


Figura 77. Supervivencia global (meses) y THOR (umbral 40%) ($p=0,389$)

➤ THOR (umbral 40%) en grupo de GANGLIOS NEGATIVOS

En los 53 casos de ganglios negativos hubo 27 casos con THOR < 40% con 19 supervivientes (70,4%) y 26 casos THOR \geq 40% con 22 supervivientes (84,6%). La supervivencia global media con ganglios negativos y THOR < 40% fue de 110,1 meses (+/- 8,5), mientras con ganglios negativos y THOR \geq 40% fue de 132,2 meses (+/- 8,2). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia ($p=0,250$)

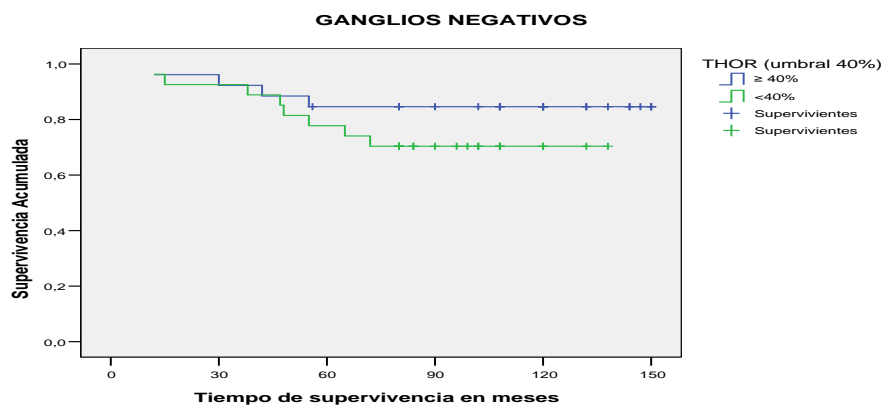


Figura 78. Ganglios Negativos: Supervivencia Global y THOR (umbral 40%) ($p=0,250$)

➤ THOR (umbral 40%) en grupo de GANGLIOS POSITIVOS

Se registraron en los 59 casos de ganglios positivos, 30 casos con THOR < 40% siendo 19 supervivientes (63,3%) y 29 casos con THOR \geq 40% siendo 17 supervivientes (58,6%).

La supervivencia global media en las pacientes con ganglios positivos y THOR < 40% fue de 102,6 meses (+/- 10,8), mientras que en los casos con ganglios positivos y con THOR \geq 40% la supervivencia global media fue de 109,2 meses (+/- 9,0).

No fueron registradas diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia ($p=0,871$) (Fig. 79).

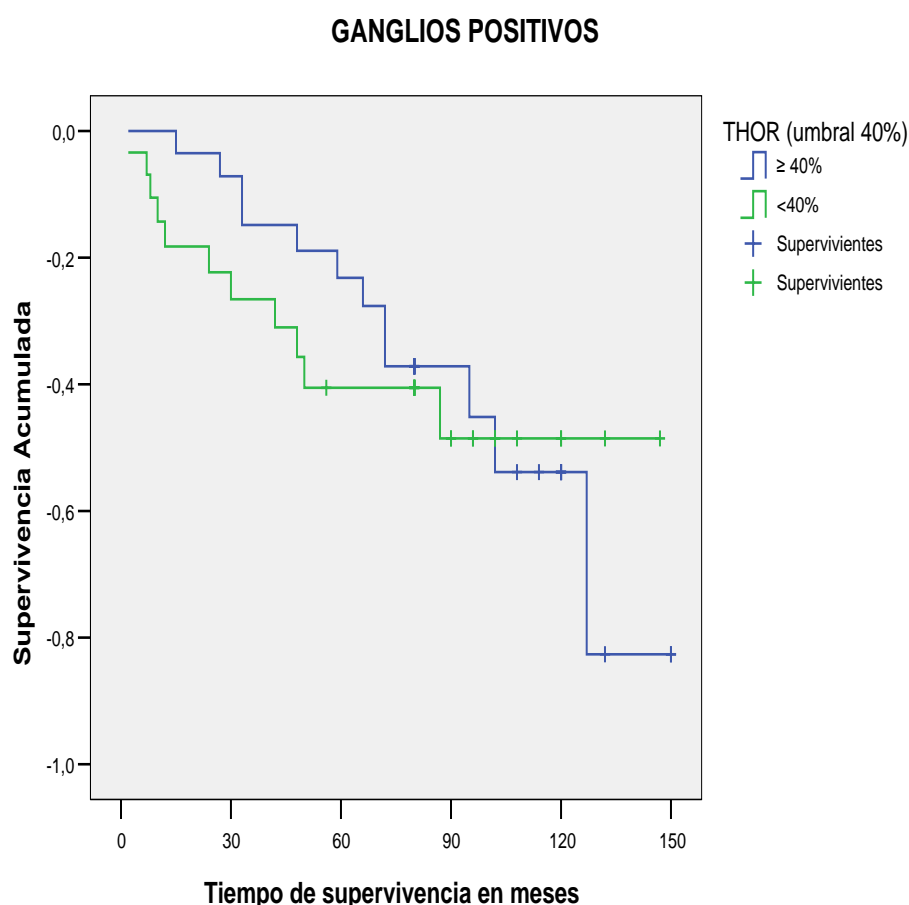


Figura 79. Ganglios Positivos: Supervivencia Global (meses) y THOR (umbral 40%) ($p=0,871$)

➤ THOR (umbral 40%) en grupo de TAMAÑO PEQUEÑO ≤ 2CM

La supervivencia global media en las pacientes con tumor de tamaño pequeño ≤ 2 cm y THOR $< 40\%$ fue de 114,3 meses ($\pm 8,7$), y en los casos con tumor de tamaño pequeño ≤ 2 cm con THOR $\geq 40\%$ fue de 125,6 meses ($\pm 9,8$). ($p=0,431$) (Fig. 80)

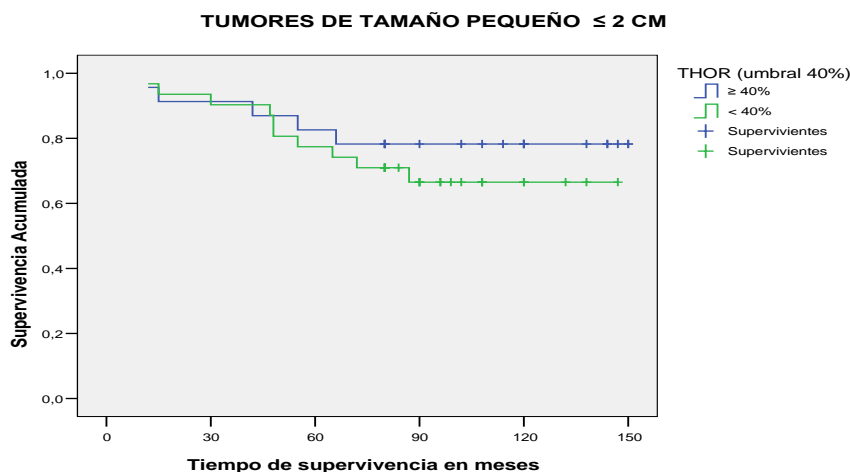


Figura 80. Tumores Tamaño ≤ 2 cm: Supervivencia Global y THOR (umbral 40%) ($p=0,431$)

➤ THOR (umbral 40%) en grupo de TAMAÑO GRANDE > 2CM

En 58 casos con tumores grandes, hubo 26 casos THOR $< 40\%$ con 17 supervivientes (65,4%) y 32 casos THOR $\geq 40\%$ con 21 supervivientes (65,6%). Supervivencia global media con tumor grande y THOR $< 40\%$ de 93,7 meses ($\pm 10,4$) y con THOR $\geq 40\%$ de 117,4 meses ($\pm 8,1$), sin diferencias estadísticas significativas ($p=0,535$) (Fig. 81)

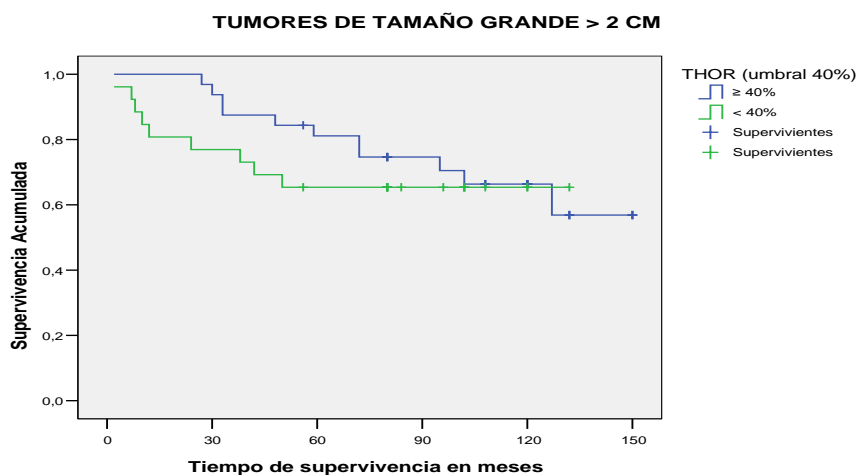


Figura81. Tumores Tamaño > 2 cm: Supervivencia Global y THOR (umbral 40%) ($p=0,535$)

➤ THOR (umbral 40%) en grupo de “LUMINALES”

En los 84 casos de pacientes con tumores “Luminales” hubo 44 casos con THOR < 40% siendo 33 supervivientes (75%) y 40 casos con THOR \geq 40% siendo 29 supervivientes (72,5%). La supervivencia global media en las pacientes con tumor “Luminal” y con THOR < 40% fue de 120,3 meses (+/- 7,1), mientras que en los casos con tumor “Luminal” pero con THOR \geq 40% fue de 120,9 meses (+/- 7,6). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia ($p=0,841$).

➤ THOR (umbral 40%) en grupo de “NO-LUMINALES”

Se registraron en los 28 casos de “No-luminales”, 13 casos con THOR < 40% siendo 5 supervivientes (38,5%) y 15 casos con THOR \geq 40% siendo 10 supervivientes (66,7%). La supervivencia global media en las pacientes con tumor “No-luminal” y con THOR < 40% fue de 61,3 meses (+/- 13,2), mientras que en los casos con tumor “No-luminal” pero con THOR \geq 40% fue de 120,7 meses (+/- 10,3). Hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia ($p=0,015$) (Fig.82).

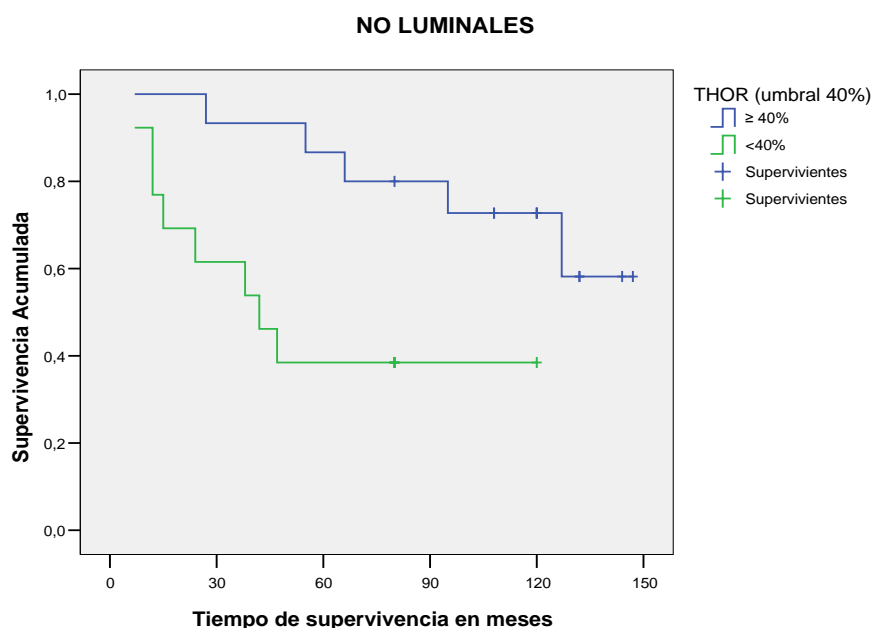


Figura 82. Tumores “No Luminales”: Supervivencia Global y THOR (umbral 40%) ($p=0,015$)

D. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

➤ SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD DE LA POBLACIÓN

La supervivencia libre de enfermedad media fue 113,8 meses (+/- 5,0) (Fig. 83).

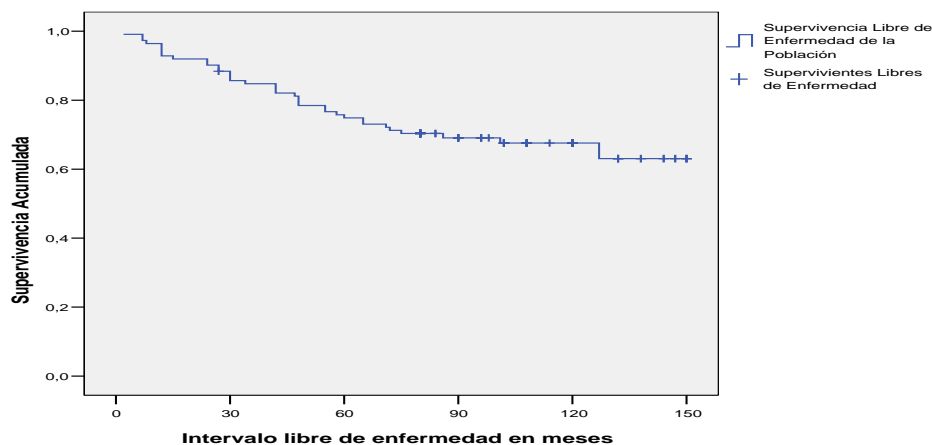


Figura 83. Supervivencia Libre de Enfermedad (meses)

1. TAMAÑO

Se registraron 54 casos con tumor ≤ 2 cm con 39 supervivientes libres de enfermedad (72,2%), y en los 58 casos con tumores > 2 cm hubo 37 supervivientes libres de enfermedad (63,8%). La supervivencia libre de enfermedad media en los casos con tumor ≤ 2 cm fue 119,9 meses (+/- 6,7), y con tumor > 2 cm fue 108,1 meses (+/- 7,4).

No hubo diferencias estadísticas significativas ($p=0,283$) (Fig. 84)

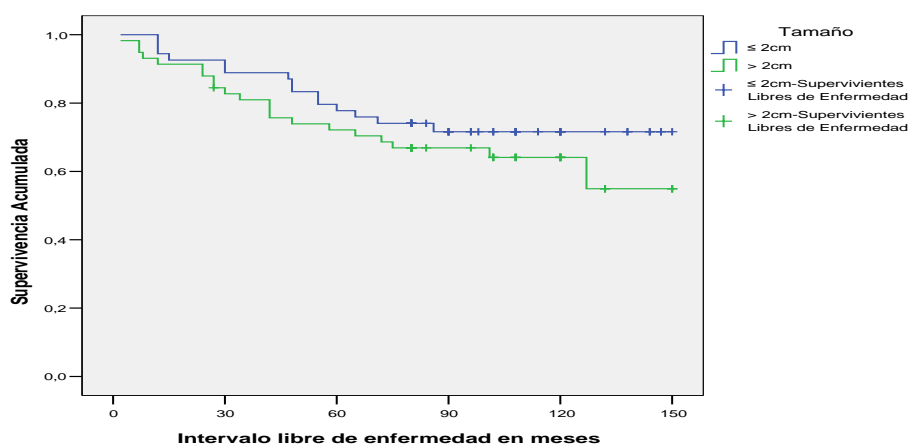


Figura 84. Supervivencia Libre de Enfermedad y Tamaño de tumor (≤ 2 cm y > 2 cm) ($p=0,283$)

2. GRADO HISTOLÓGICO

Se registraron 10 supervivientes libres de enfermedad (90,9%) en 11 casos grado 1, 48 (64%) en 75 casos con grado 2 y 18 (69,2%) en 26 casos con grado 3 ($p=0,369$).

➤ GRADO HISTOLÓGICO (G1 vs G2+G3)

En los 11 casos grado 1, la tasa de supervivencia libre de enfermedad media fue del 90,9% y en el grupo de 101 casos grado 2 y 3 fue del 65,3%. ($p=0,115$) (Fig. 85).

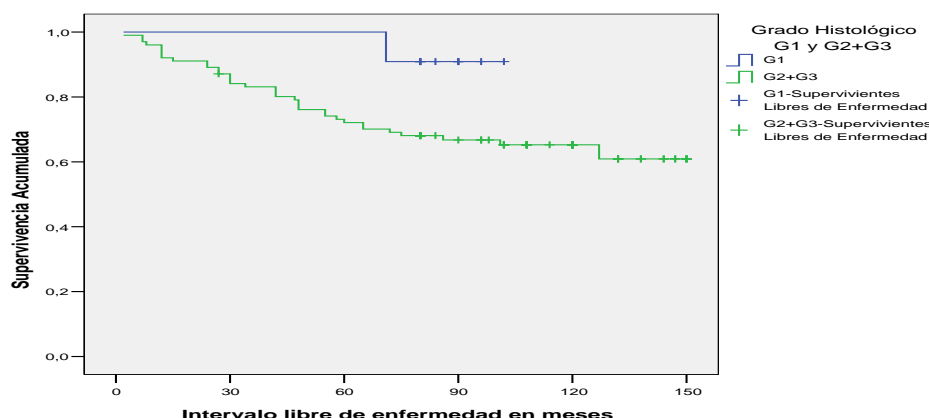


Figura 85. Grado Histológico (G1 y G2+G3) ($p=0,115$)

3. INVASIÓN LINFOVASCULAR

En 58 casos con invasión linfovascular, la supervivencia libre de enfermedad media fue 62,1%, frente al 74,1% de los 154 casos sin invasión linfovascular ($p=0,285$) (Fig. 86).

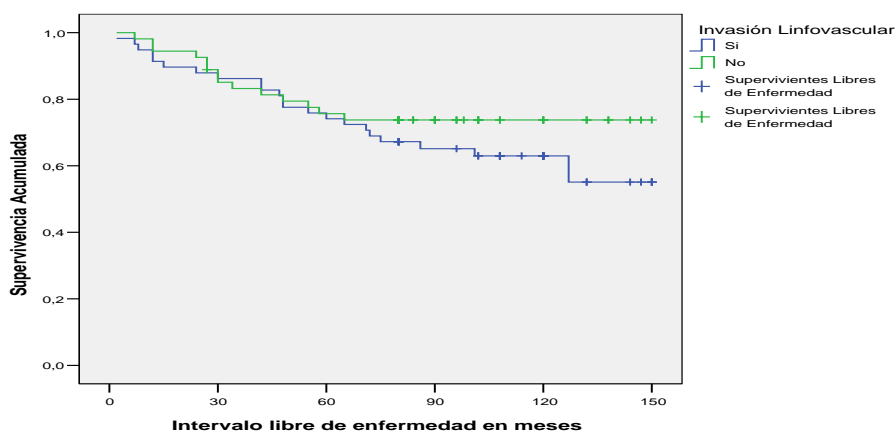


Figura 86. Supervivencia Libre de Enfermedad vs Invasión Linfovascular ($p=0,285$)

4. AFECTACIÓN GANGLIONAR

En los 53 casos sin afectación ganglionar la supervivencia libre de enfermedad media fue 77,4%, frente al 59,3% de las pacientes con afectación ganglionar. La supervivencia libre de enfermedad media en las pacientes con ganglios negativos fue 124,5 meses (+/- 6,5), y con ganglios positivos fue 103,6 meses (+/- 7,4). Hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,043$) (Fig. 87).

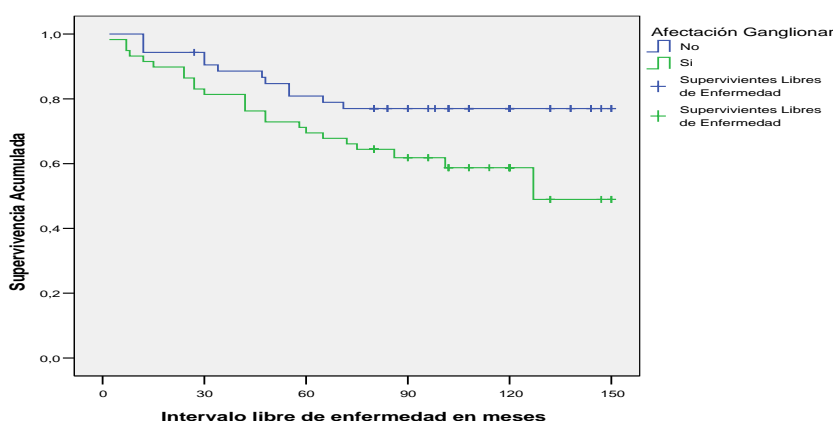


Figura 87. Supervivencia Libre de Enfermedad y Afectación Ganglionar ($p=0,043$)

5. RECEPTORES HORMONALES

En los 28 casos con receptores hormonales negativos, hubo 15 supervivientes (53,6%) y en el grupo de 84 casos con receptores hormonales positivos hubo 61 supervivientes (72,6%). La supervivencia libre de enfermedad media en las pacientes con receptores hormonales negativos fue 94,6 meses (+/- 10,8) y con receptores hormonales positivos fue 119,9 meses (+/- 5,4). Se registraron diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,039$) (Fig. 88).

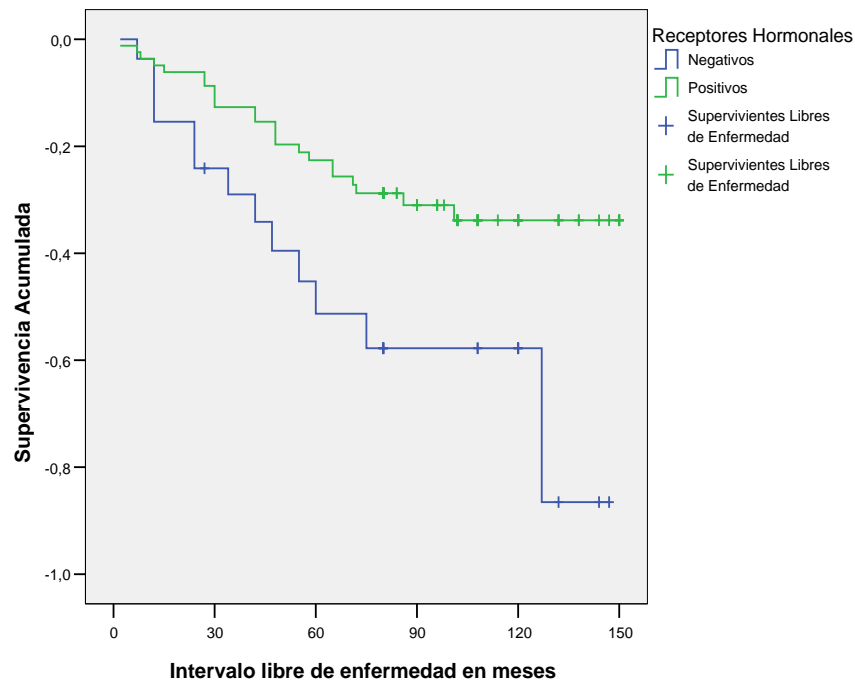


Figura 88: - Supervivencia Libre de Enfermedad y expresión de RH ($p=0,039$)

➤ RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

En las pacientes con RE negativos, la tasa de supervivencia libre de enfermedad fue de 56,7% y del 72% en aquellos con expresión de RE. No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,091$) (Fig.89).

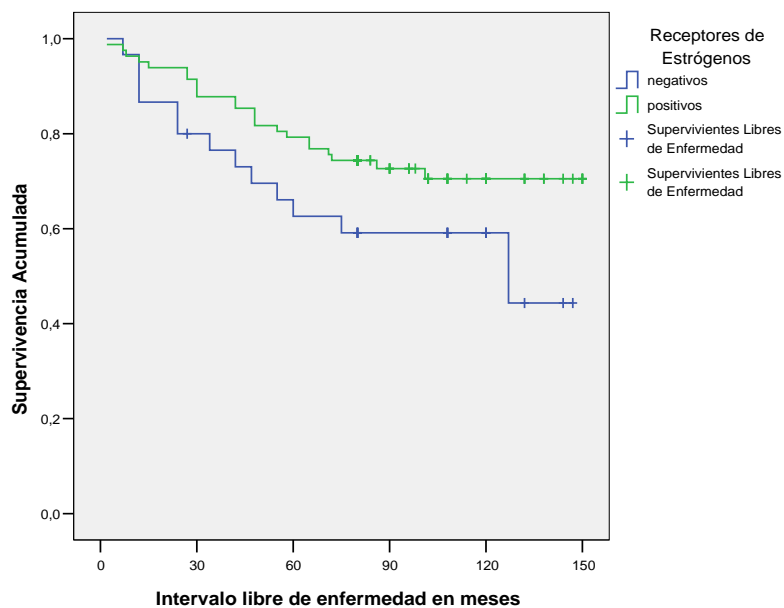


Figura 89: Intervalo Libre de Enfermedad y expresión de RE ($p=0,091$)

➤ RECEPTORES DE PROGESTERONA

La tasa de supervivencia libre de enfermedad de las pacientes con ausencia de expresión de RP fue del 50% (89,3 meses) y en el grupo con RP positivos fue del 80,3% (129,8 meses), alcanzando estas diferencias la significación estadística ($p=0,000$) (Fig. 90).

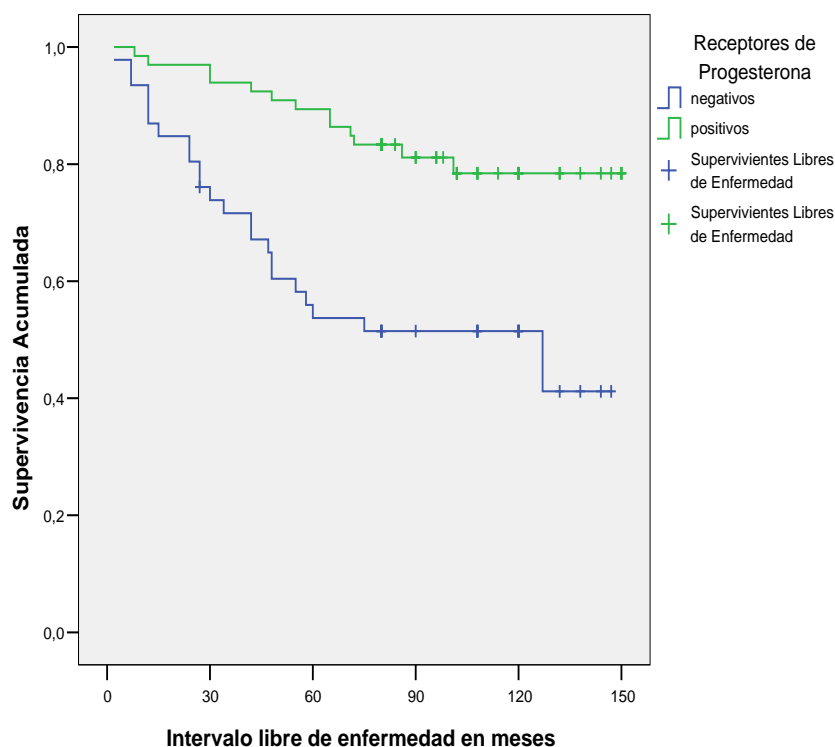


Figura 90. Supervivencia Libre de Enfermedad y expresión de RP ($p=0,000$)

6. HER2

En nuestro estudio, se registraron 96 casos con Her2 negativo y de este grupo hubo 66 supervivientes (68,8%) y en el grupo de 16 casos con Her2 positivo hubo 10 supervivientes (62,5%). La supervivencia libre de enfermedad media en las pacientes con Her2 negativos fue de 114,8 meses ($\pm 5,4$), mientras que en los casos con Her2 positivos fue de 104,3 meses ($\pm 13,2$). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,577$).

7. Ki67

➤ Ki67 (umbral 14%)

En nuestro estudio hubo 49 casos con $Ki67 < 14\%$ y de este grupo hubo 33 supervivientes libres de enfermedad (67,3%) y en el grupo de 51 casos con $Ki67 \geq 14\%$ hubo 34 supervivientes libres de enfermedad (66,7%).

La supervivencia libre de enfermedad media en pacientes con $Ki67 < 14\%$ fue 115,6 meses ($\pm 7,2$) y con $Ki67 \geq 14\%$ fue 110,4 meses ($\pm 8,0$).

No se registraron diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,738$) (Fig. 91).

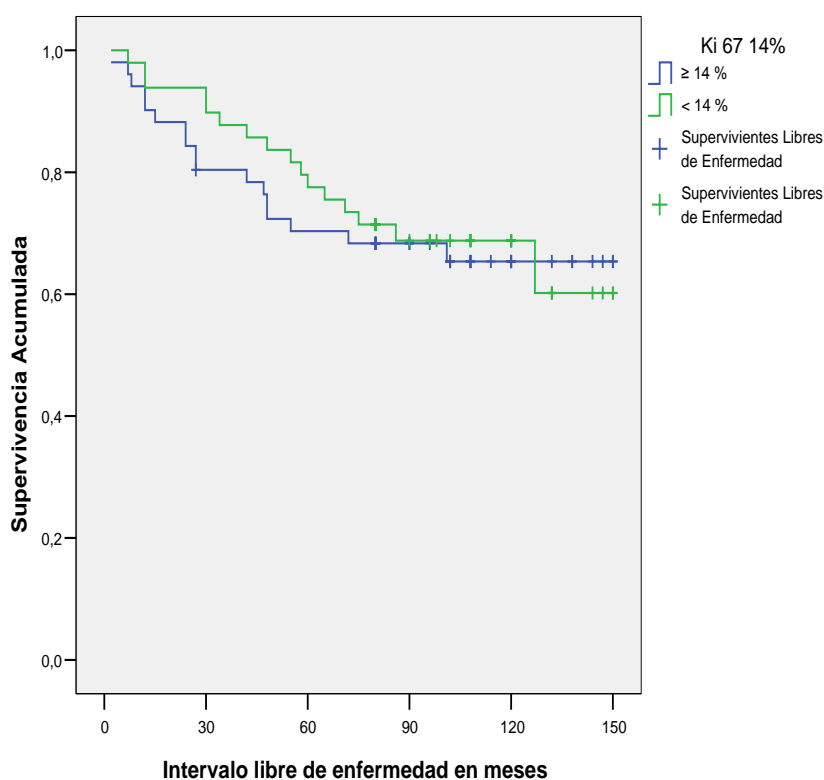


Figura 91. Supervivencia Libre de Enfermedad y expresión de Ki67 (umbral 14%) ($p=0,738$)

➤ Ki67 (umbral 20%)

En los 59 casos con $Ki67 < 20\%$ hubo 37 supervivientes libres de enfermedad (62,7%) y 30 casos (73,2%) en los 41 casos con $Ki67 \geq 20\%$. La supervivencia libre de enfermedad media en pacientes con $Ki67 < 20\%$ fue 110,6 meses ($\pm 6,8$) y con $Ki67 \geq 20\%$ fue 116,6 meses ($\pm 8,7$). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,449$) (Fig. 92).

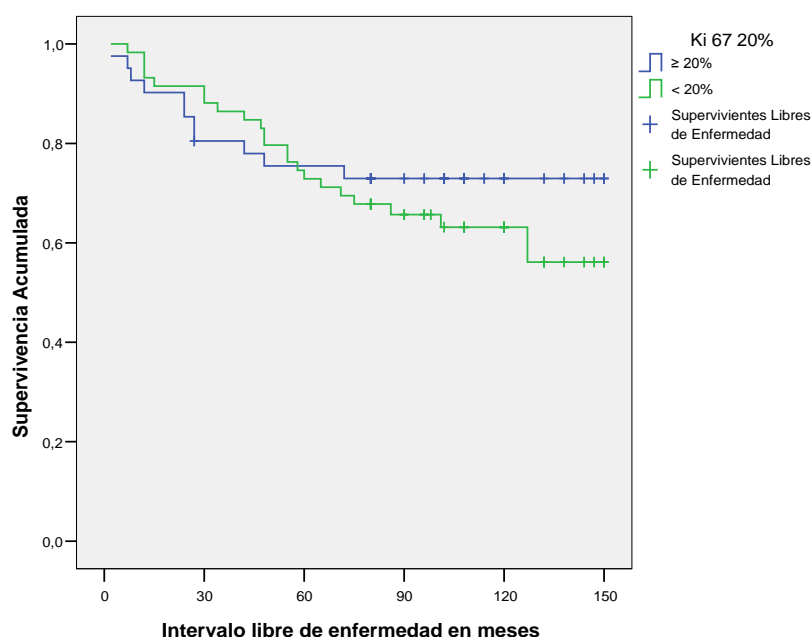


Figura 92. Supervivencia Libre de Enfermedad y expresión de Ki67 (umbral 20%) ($p=0,449$)

➤ Ki67 (umbral 40%)

En nuestro estudio, se registraron 83 casos con $Ki67 < 40\%$ y de este grupo hubo 53 supervivientes libres de enfermedad (63,9%) y 14 casos (82,4%) en el grupo de 17 casos con $Ki67 \geq 40\%$. La supervivencia libre de enfermedad media en las pacientes con $Ki67 < 40\%$ fue de 109,9 meses ($\pm 6,0$), mientras que en los casos con $Ki67 \geq 40\%$ fue de 124,7 meses ($\pm 11,6$). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,193$).

➤ Ki67 (umbral 14%) en grupo de GANGLIOS NEGATIVOS

En los 48 casos de ganglios negativos hubo 20 casos con $Ki67 < 14\%$ siendo 14 supervivientes libres de enfermedad (70%) y 23 casos (82,1%) en el grupo de 28 casos con $Ki67 \geq 14\%$. La supervivencia libre de enfermedad media en las pacientes con ganglios negativos y $Ki67 < 14\%$ fue de 116,6 meses (+/- 11,6) y en los casos con ganglios negativos y $Ki67 \geq 14\%$ fue de 129,0 meses (+/- 8,6). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,364$).

➤ Ki67 (umbral 20%) en grupo de GANGLIOS NEGATIVOS

En los 48 casos de ganglios negativos con $Ki67 < 20\%$ la supervivencia libre de enfermedad media fue de 64,3% y en los 20 casos con $Ki67 \geq 20\%$ fue del 95%. Hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,020$) (Fig. 93)

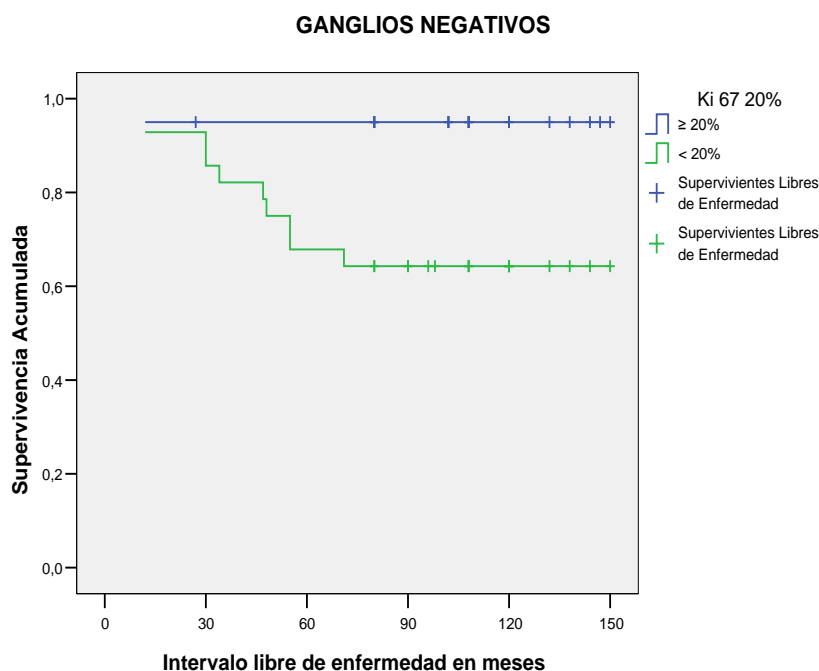


Figura 93. Supervivencia Libre de Enfermedad: Ki67 (umbral 20%) en pacientes con Ganglios Negativos ($p=0,020$)

➤ Ki67 (umbral 40%) en grupo de GANGLIOS NEGATIVOS

Se registraron en los 48 casos de ganglios negativos 40 casos con $Ki67 < 40\%$ siendo 30 supervivientes libres de enfermedad (75%) y 7 casos (87,5%) en el grupo de los 8 casos con $Ki67 \geq 40\%$. La supervivencia libre de enfermedad media en las pacientes con ganglios negativos y $Ki67 < 40\%$ fue 121,7 meses (+/- 7,8) y en los casos con ganglios negativos y $Ki67 \geq 40\%$ fue 130,1 meses (+/- 15,7). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,477$).

➤ Ki67 (umbral 14%) en grupo de GANGLIOS POSITIVOS

En los 52 casos de ganglios positivos hubo 29 casos con $Ki67 < 14\%$ siendo 19 supervivientes libres de enfermedad (65,5%) y 23 casos con $Ki67 \geq 14\%$ siendo 11 supervivientes libres de enfermedad (47,8%). Sin diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,090$) (Fig.94).

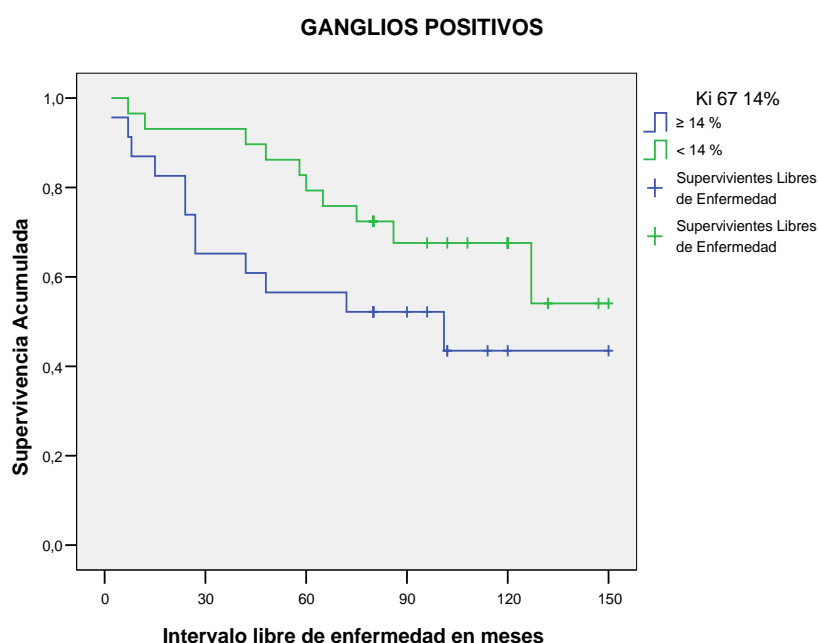


Figura 94. Supervivencia Libre de Enfermedad: Ki67 (umbral 14%) en pacientes con Ganglios Positivos ($p=0,090$)

➤ Ki67 (umbral 20%) en grupo de GLANGLIOS POSITIVOS

Se registraron en los 52 casos de ganglios positivos 31 casos con Ki67 < 20% siendo 19 supervivientes libres de enfermedad (61,3%) y 21 casos con Ki67 ≥ 20% siendo 11 supervivientes libres de enfermedad (52,4%). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,262$) (Fig.95)

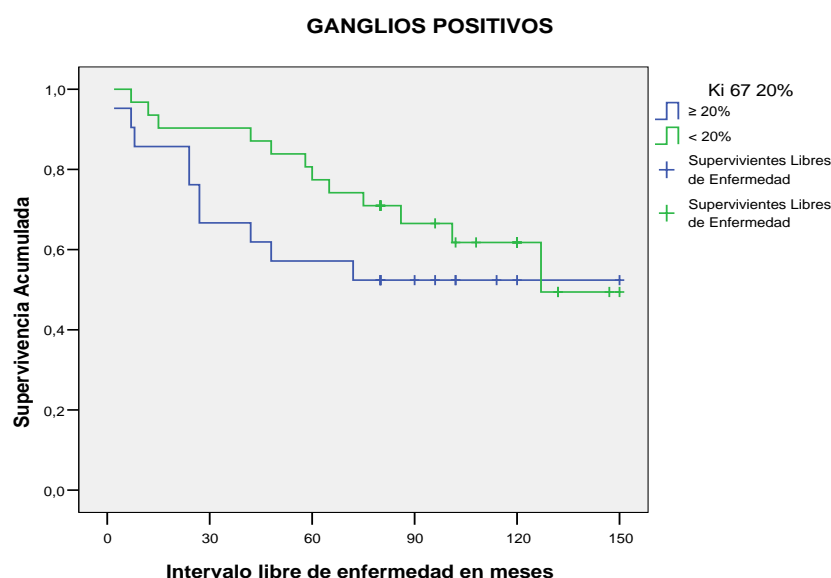


Figura 95. Supervivencia Libre de Enfermedad: Ki67 (umbral 20%) en pacientes con Ganglios Positivos ($p=0,262$)

➤ Ki67 (umbral 40%) en grupo de GLANGLIOS POSITIVOS

En los 52 casos de ganglios positivos hubo 43 casos con Ki67 < 40% siendo 23 supervivientes libres de enfermedad (53,5%) y 9 casos con Ki67 ≥ 40% siendo 7 supervivientes libres de enfermedad (77,8%). La supervivencia libre de enfermedad media en las pacientes con ganglios positivos y Ki67 < 40% fue de 99,1 meses (+/- 8,6) y en los casos con ganglios positivos y Ki67 ≥ 40% fue de 99,0 meses (+/- 13,0). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,309$).

8. ESTADIO CLÍNICO

En nuestro estudio, se registraron 36 casos Estadio I y de este grupo hubo 26 supervivientes libres de enfermedad (72,2%), 36 casos Estadio IIA y de este grupo hubo 29 supervivientes libres de enfermedad (80,6%), 18 casos Estadio IIB y de este grupo hubo 10 supervivientes libres de enfermedad (55,6%) y en el grupo de 22 casos con Estadio IIIA hubo 11 supervivientes libres de enfermedad (50,0%). La supervivencia libre de enfermedad media en las pacientes con tumor Estadio I fue de 119,6 meses (+/- 8,3), en las pacientes con tumor Estadio IIA fue de 127,5 meses (+/- 7,6), en las pacientes con tumor Estadio IIB fue de 96,1 meses (+/- 14,5) y en los casos con tumor Estadio IIIA fue de 90,7 meses (+/- 9,9). Se registraron diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,032$) (Fig.96).

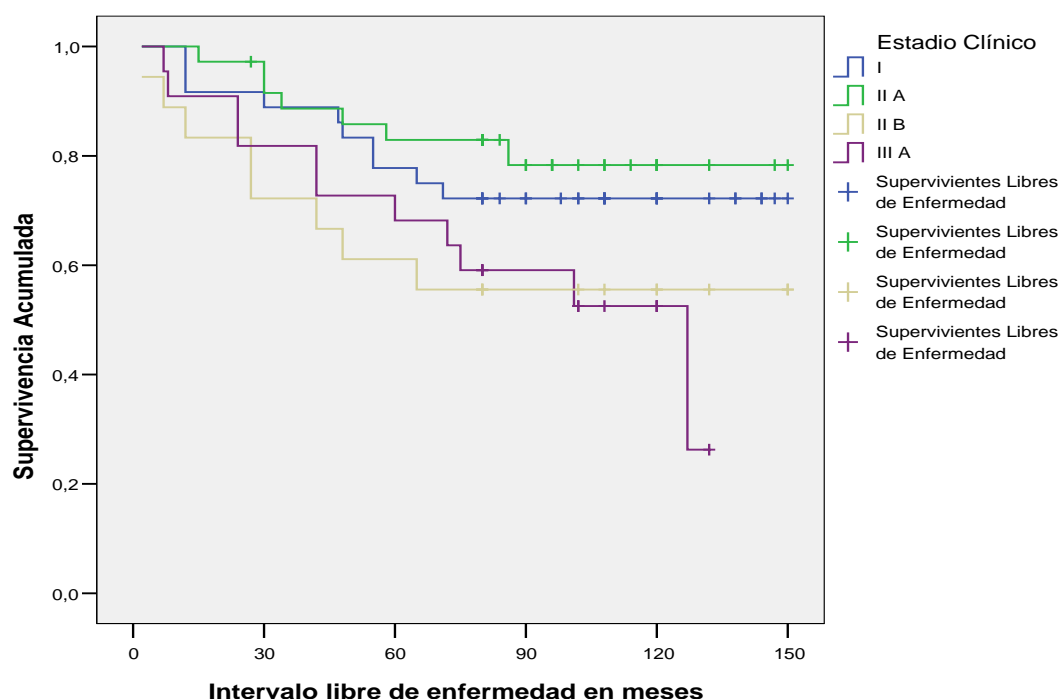


Figura 96. Supervivencia Libre de Enfermedad y Estadio Clínico ($p=0,032$)

9. SUBTIPO MOLECULAR SUBROGADO IHQ

Se registraron 11 casos “Luminal A” y de esto grupo hubo 10 supervivientes libres de enfermedad (90,9%), 73 casos “Luminal B” y de esto grupo hubo 51 supervivientes libres de enfermedad (69,9%), 6 casos “HER2” y de esto grupo hubo 4 supervivientes libres de enfermedad (66,7%) y en el grupo de 22 casos con “*Basal Like*” hubo 11 supervivientes libres de enfermedad (50%). La supervivencia libre de enfermedad media en las pacientes con tumor “Luminal A” fue de 93,7 meses (+/- 2,1), en las pacientes con tumor “Luminal B” fue de 116,8 meses (+/- 6,0), en las pacientes con tumor “HER2” fue de 107,1 meses (+/- 22,1) y en los casos con tumor “*Basal Like*” fue de 90,5 meses (+/- 12,1). Se registraron diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,013$) (Fig. 97).

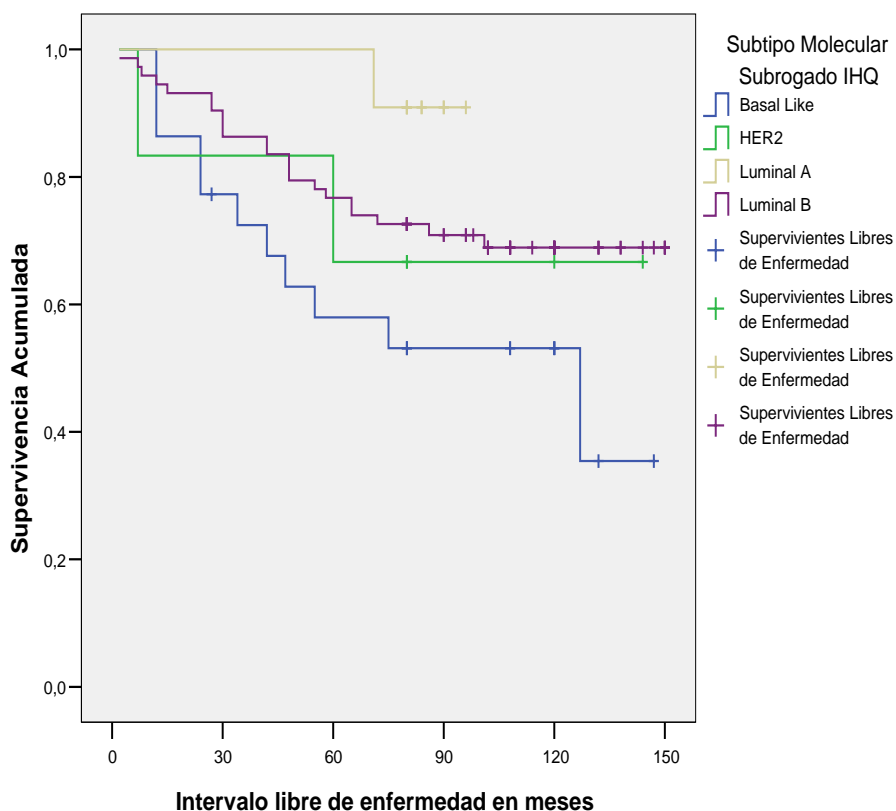


Figura 97. Supervivencia Libre de Enfermedad y Subtipo Molecular Subrogado IHQ ($p=0,013$)

➤ SUBTIPO MOLECULAR SUBROGADO IHQ (Luminal vs No-luminal)

En el grupo “No-luminal” la supervivencia fue del 53,6% y en el “Luminal” fue del 72,6%. La estimación de la supervivencia libre de enfermedad media en las pacientes con tumores “Luminal” fue de 119,9 meses (+/- 5,4), mientras que en los casos con tumores “No-luminal” fue de 94,6 meses (+/- 10,8). Hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,039$) (Fig.98).

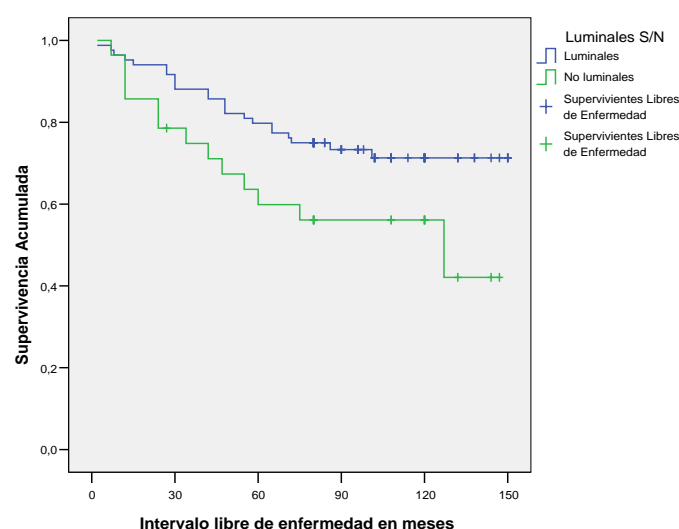


Figura 98. Supervivencia Libre de Enfermedad en tumores “Luminales” y “No-luminales” ($p=0,039$)

10.TELOMERASA

Se registraron 57 casos con THOR < 40% y de esto grupo hubo 37 supervivientes libres de enfermedad (64,9%) y en el grupo de 55 casos con THOR \geq 40% hubo 39 supervivientes libres de enfermedad (70,9%). La supervivencia libre de enfermedad media en las pacientes con THOR < 40% fue de 107,0 meses (+/- 7,3), mientras que en los casos con THOR \geq 40% fue de 119,6 meses (+/- 6,5); sin diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,346$) (Fig. 99).

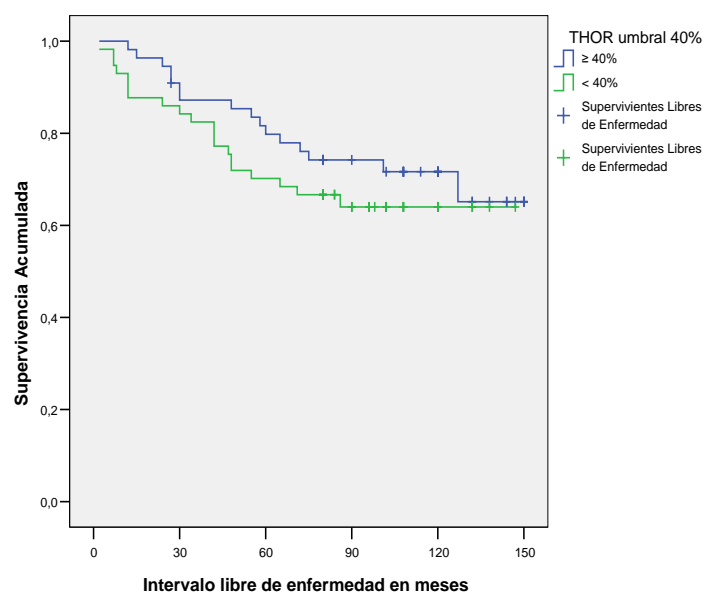


Figura 99. Supervivencia Libre de Enfermedad en función de THOR (umbral 40%) ($p=0,346$)

➤ THOR (umbral 40%) en grupo de GANGLIOS NEGATIVOS

En los 27 casos THOR < 40% la tasa de supervivencia libre de enfermedad fue del 70,4% y 26 casos THOR \geq 40% con una supervivencia libre de enfermedad media del 84,6%. No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,269$) (Fig.100).

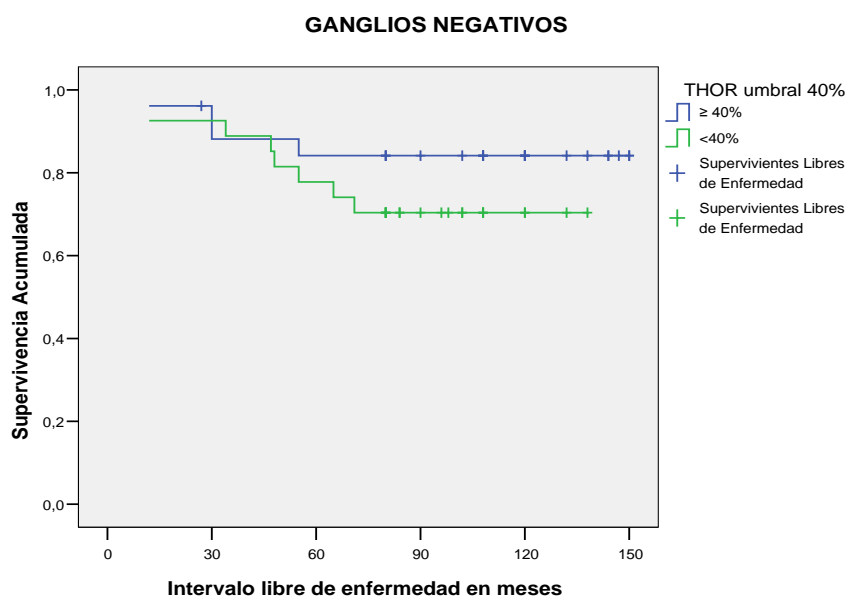


Figura 100. Supervivencia Libre de Enfermedad y THOR (umbral 40%) en pacientes Ganglios Negativos ($p=0,269$)

➤ THOR (umbral 40%) en grupo de GANGLIOS POSITIVOS

En los 59 casos de ganglios positivos hubo 30 casos con THOR < 40% siendo 18 supervivientes libres de enfermedad (60,0%) y 29 casos con THOR \geq 40% siendo 17 supervivientes libres de enfermedad (58,6%).

La supervivencia libre de enfermedad media en las pacientes con ganglios positivos y THOR < 40% fue de 98,9 meses (+/- 10,9) y con ganglios positivos y THOR \geq 40% fue de 108,3 meses (+/- 9,3).

No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,741$) (Fig.101)

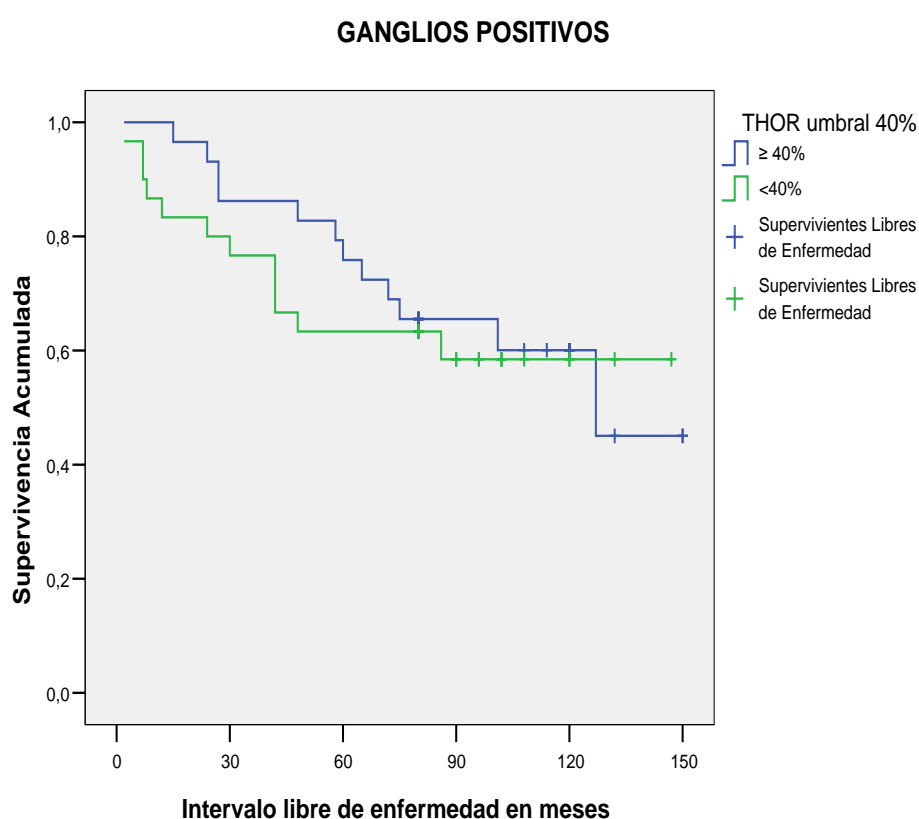


Figura 100. Supervivencia Libre de Enfermedad y THOR (umbral 40%) en pacientes con Ganglios Positivos ($p=0,741$)

➤ THOR (umbral 40%) en grupo de TAMAÑO PEQUEÑO ≤ 2 CM

En los 54 casos, con tumores de tamaño pequeño ≤ 2 cm, se registraron 31 casos con THOR $< 40\%$ siendo 21 supervivientes (67,7%) y 23 casos con THOR $\geq 40\%$ siendo 18 supervivientes libres de enfermedad (78,3%).

La supervivencia libre de enfermedad media en las pacientes con tumor de tamaño pequeño ≤ 2 cm y con THOR $< 40\%$ fue de 114,1 meses ($\pm 8,7$), mientras que en los casos con tumor de tamaño pequeño ≤ 2 cm pero con THOR $\geq 40\%$ fue de 124,8 meses ($\pm 10,1$). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,436$) (Fig.101).

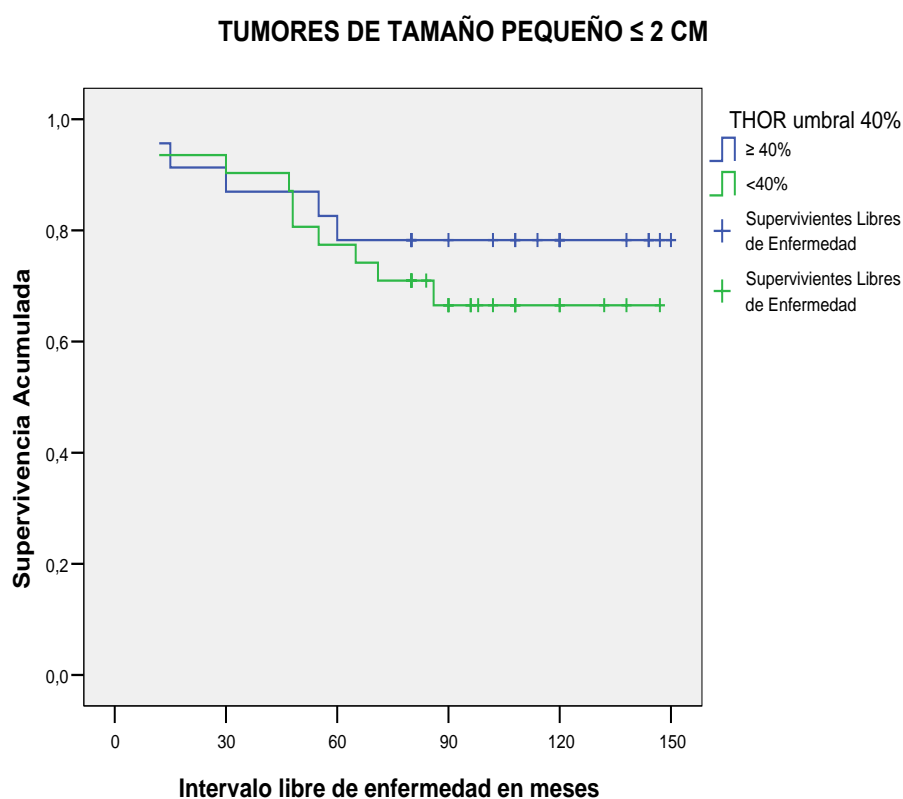


Figura 101. Supervivencia Libre de Enfermedad y THOR (umbral 40%) en pacientes con tumores de Tamaño ≤ 2 cm ($p=0,436$)

➤ THOR (umbral 40%) en grupo de TAMAÑO GRANDE > 2CM

Se registraron en los 58 casos con tumores de tamaño grande > 2 cm, 26 casos con THOR < 40% siendo 16 supervivientes libres de enfermedad (61,5%) y 32 casos con THOR \geq 40% siendo 21 supervivientes libres de enfermedad (65,6%). La estimación de la supervivencia libre de enfermedad media en las pacientes con tumor de tamaño grande > 2 cm y con THOR < 40% fue de 89,6 meses (+/- 10,6), mientras que en los casos con tumor de tamaño grande > 2 cm pero con THOR \geq 40% fue de 115,7 meses (+/- 8,5). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,425$) (Fig. 102).

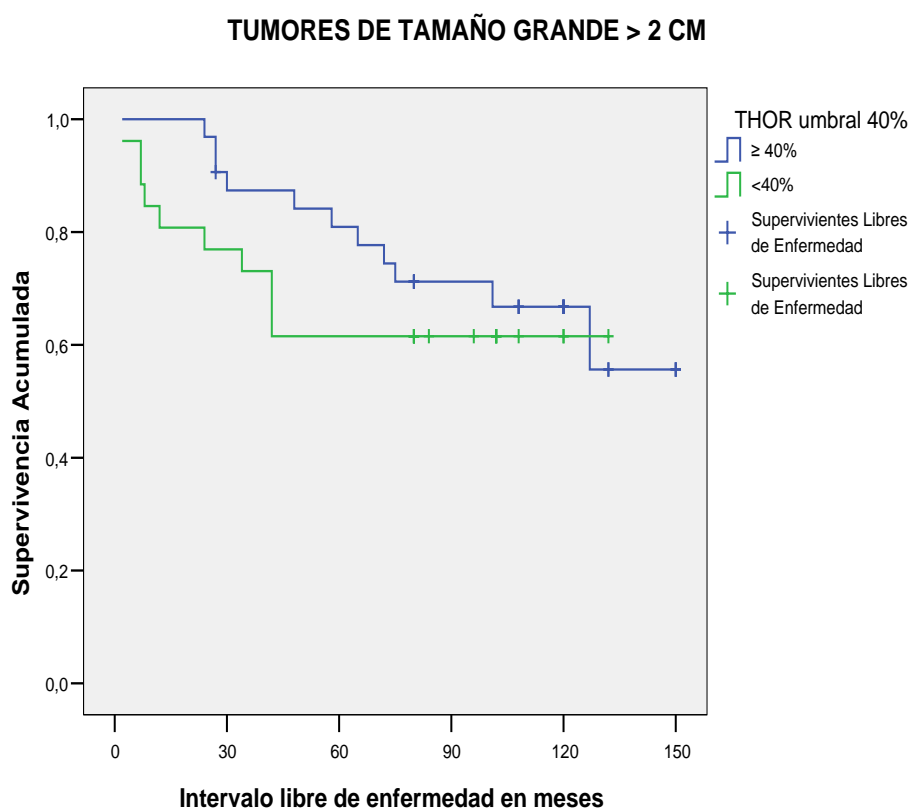


Figura 102. Supervivencia Libre de Enfermedad y THOR (umbral 40%) en pacientes con tumores de Tamaño > 2 cm ($p=0,425$)

➤ THOR (umbral 40%) en grupo de “LUMINALES”

En los 84 casos de tumores “Luminales” hubo 44 casos con THOR < 40% siendo 32 supervivientes libres de enfermedad (72,7%) y 40 casos con THOR \geq 40% siendo 29 supervivientes libres de enfermedad (72,5%). La supervivencia libre de enfermedad media en las pacientes con tumor “Luminal” y THOR < 40% fue 117,8 meses (+/- 7,3) y con tumor “Luminal” y THOR \geq 40% fue 120,2 meses (+/- 7,8). No hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,990$).

➤ THOR (umbral 40%) en grupo de “NO-LUMINALES”

En los 28 casos de “No-luminales”, hubo 13 casos THOR < 40% con 5 supervivientes libres de enfermedad (38,5%) y 15 casos THOR \geq 40% con 10 supervivientes libres de enfermedad (66,7%). La supervivencia libre de enfermedad media en las pacientes con tumor “No-luminal” y THOR < 40% fue de 60,7 meses (+/- 13,3) y con tumor “No-luminal” y THOR \geq 40% fue de 117,1 meses (+/- 11,2). Hubo diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,032$) (Fig.103).

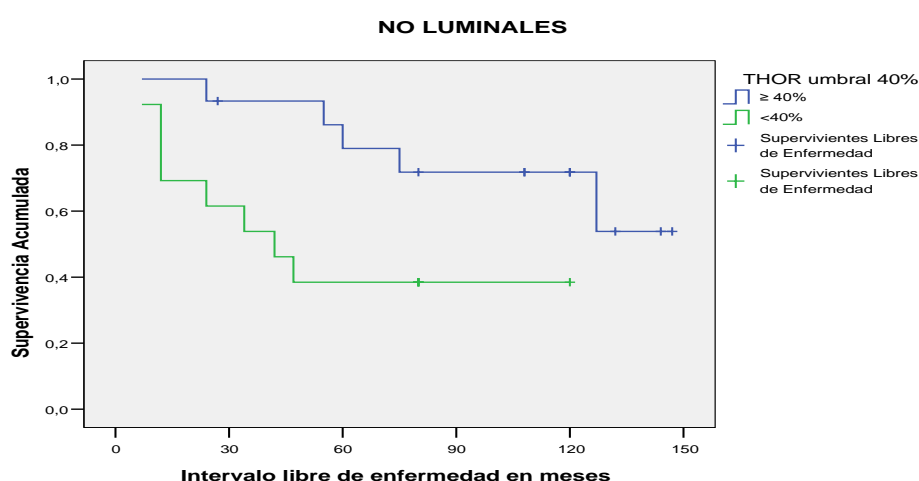


Figura 103. Supervivencia Libre de Enfermedad y THOR (umbral 40%) en pacientes con tumores “No-luminal” ($p=0,032$)

V. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad de especial relevancia, considerando que es el tumor maligno de mayor incidencia y mortalidad entre las mujeres europeas, por lo que constituye un importante problema de salud pública en los países desarrollados. Programas como *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER) de Estados Unidos han analizado los cambios en los patrones de incidencia, mortalidad y supervivencia en cáncer, confirmando que, específicamente, el cáncer de mama es la causa más frecuente de muerte en mujeres entre los 40 y 55 años.¹⁷⁸

España presenta una tasa de incidencia menor a la media de Europa, ocupando una posición intermedia entre los países occidentales y del este de Europa, aunque también se trata del tumor maligno más frecuente entre la población femenina. Según la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), la tasa de incidencia estandarizada estimada para España fue de 93,6 casos por 100.000 mujeres-año en 2006, frente a los 110 casos por cada 100.000 mujeres en Europa.¹⁷⁸

De acuerdo con los datos de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), el cáncer de mama ha sido en 2015, el tumor más frecuentemente diagnosticado en España en la mujer (27.747 casos). En Andalucía es el tumor maligno más frecuente en las mujeres, con una incidencia de 2.500 nuevos casos por año (67 casos por cada 100.000 mujeres). Es, a su vez, la primera causa de muerte por cáncer en el colectivo femenino, con una tasa bruta de mortalidad de 24,1 por cada 100.000 habitantes.¹⁷⁸

Aunque la incidencia del cáncer de mama en Portugal es inferior a la media europea, es el tumor maligno más frecuente en las mujeres, con una tasa de incidencia de 60 casos

por cada 100.000 mujeres.¹⁷⁹ La incidencia ha ido progresiva y regularmente aumentando entre los años de 2009 y 2010, con un 4% más de nuevos casos.

Según los datos de la OECD, en 2013, Portugal registró una de las más bajas tasas de mortalidad en Europa, similar a la de España, Suecia, Chipre, República Checa, Polonia y Finlandia. Las tasas de mortalidad por cáncer de mama han disminuido en la población portuguesa en la última década, con una variación de -2% anual y se mantiene estabilizada desde 2010.¹⁷⁹

Si bien que la tasa de incidencia del cáncer de mama en Portugal es mayor en las zonas litorales, la tasa de mortalidad es mayor en las zonas del interior del país. En general, las tasas de mortalidad parecen diferir entre las regiones geográficas de Portugal, con una tasa de mortalidad de 9,5 / 1 000 habitantes en la región de Lisboa, 14,4 / 1 000 en Alentejo, 11,6 / 1 000 en Algarve y 11,0 / 1 000 en la Región Autónoma de Madeira.¹⁷⁹ Los factores implicados pueden incluir factores demográficos y aspectos socioeconómicos, características biológicas de los tumores y acceso a la atención médica.¹⁷⁹

➤ DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA SERIE

Nuestro estudio ha tratado de conocer la relevancia de la actividad de la telomerasa en el comportamiento evolutivo del cáncer de mama, así como su relación con la proliferación celular.

Para ello se han estudiado 112 pacientes con carcinoma invasivo de mama, seleccionados de una serie de 320 casos procedentes de los hospitales de Faro y Portimão que integran el Centro Hospitalario del Algarve (Portugal).

Las pacientes fueron clasificadas de acuerdo con criterios anatomopatológicos de extensión local y regional del tumor, y valoración de los indicadores habituales de agresividad biológica tumoral y predictivos de respuesta al tratamiento, tanto de tipo histopatológico como inmunohistoquímico.

Consideramos que nuestra serie es similar a otras encontradas en la literatura tanto en cuanto a los parámetros clínicos como anatomopatológicos o de tratamiento.

En esta serie, la relación postmenopáusica / pre-menopáusica es de 2:1 ocasionando una elevación de la edad media por un exceso de pacientes postmenopáusicas.

El tamaño tumoral mostró porcentajes similares de tumores T1 y T2 (48,2 y 51,8%, respectivamente). De acuerdo con Cianfrocca M y cols,¹⁸⁰ el tamaño tumoral en el cáncer de mama se correlaciona con la presencia y número de ganglios linfáticos axilares implicados y es un factor pronóstico independiente también relacionado con la recurrencia, lo que, aunque en parte se refleja en los resultados de nuestro estudio, no logra una significación estadística.

La mayor parte de nuestra casuística corresponde al tipo histológico de carcinoma ductal invasor (80,3%), siendo el más frecuente de todos, junto a un 17% de carcinomas lobulillares, y escasa representación de otros tipos histológicos, como es habitual en otras series.

En nuestro estudio, los carcinomas de mama moderadamente diferenciados fueron los más frecuentes con 67% (75 casos), seguidos de los pobremente diferenciados con 26 casos (23,2%), y 11 casos (9.8%) de bien diferenciados. Tal como se refleja en otros estudios, la supervivencia de los carcinomas bien diferenciados o grado I en nuestra

serie es bastante superior a la de los grados II y III, aunque debido al pequeño número de casos de grado I no se ha obtenido significación estadística.

En nuestro estudio, un 47,3% (53 casos) de las enfermas presentaban ausencia de afectación ganglionar axilar. Numerosos estudios concluyen que el indicador pronóstico más importante para los pacientes con cáncer de mama en estadio temprano es la presencia o ausencia de afectación de los ganglios linfáticos axilares, lo que también sustentan los resultados de nuestra casuística tanto en relación con la supervivencia global como con el intervalo antes de recidiva.

Respecto a los marcadores tumorales, el porcentaje de tumores con expresión de receptores hormonales (75%) se encuentra dentro del rango habitual. También es coincidente con lo establecido en la literatura el hallazgo de una mejor supervivencia global y libre de enfermedad en las pacientes con positividad inmunohistoquímica bien de receptores de estrógenos, de receptores de progesterona, o de ambos.

En nuestra serie, se registraron solo 16 casos (14,3%) con positividad para Her2, lo que se encuentra en el límite bajo de la normalidad. Aunque, según Cianfrocca M y cols,¹⁸⁰ la sobreexpresión de Her2 está asociada a tumores más agresivos, no hemos podido constatar este hecho en la supervivencia de las pacientes, probablemente por la administración de terapia dirigida.

El subtipo molecular subrogado a IHQ más frecuente encontrado en nuestra casuística fue el Luminal, principalmente el Luminal B, seguido del *Basal Like* con un 19,6% (22 casos), y el menos frecuente fue el HER2 positivo con un 5,4% (6 casos). Al igual que en la literatura, en nuestro grupo de pacientes los carcinomas de subtipo basal son los

que peor supervivencia presentaron, mientras que los de subtipo luminal se relacionaron con el mejor pronóstico.

En relación al tratamiento realizado a las pacientes, una ligera mayoría fue sometida a cirugía conservadora o tumorectomía (50,9%). DeSantis CE,¹⁸¹ en un estudio reciente, expuso que, en los Estados Unidos, entre las mujeres con cáncer de mama en estadio temprano (I o II), el 58% se sometió a cirugía conservadora de mama. La mayoría de los pacientes de nuestro estudio se encontraban en estadios I o II (80,3%), por lo que puede considerarse como correcta la tasa de cirugía conservadora. Como es también habitual, la mayoría de las pacientes recibieron quimioterapia, incluyendo trastuzumab si estaba indicado, y radioterapia local.

En la evolución de las pacientes se observó un bajo porcentaje de recidivas regionales (3,57%), mientras que las recidivas a distancia representaron el 19,6%. Con un seguimiento de hasta 140 meses, la supervivencia global media fue de 115,4 meses, que puede considerarse dentro de los estándares en el cáncer de mama.

➤ **PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIDA CON KI67**

Nuestro trabajo ha prestado especial atención a la proliferación celular cuantificada mediante inmunohistoquímica de Ki67 y su relación con la actividad de telomerasa. Dado que no existen umbrales universalmente aceptados que dividan a los tumores de mama en baja y alta proliferación, en nuestro estudio se analizaron los umbrales del 14%, 20% y 40%. Los dos primeros por haber sido recomendados en consensos internacionales de expertos en St Gallen, y el de 40% por haber verificado, en nuestra propia casuística, ser el que mayor significación estadística obtuvo en la correlación con otros parámetros anatomopatológicos.

Los resultados de este estudio se suman a la experiencia reflejada en la literatura sobre Ki67 en el cáncer de mama y su relación con el grado histológico, la expresión de marcadores inmunohistoquímicos hormonales y la sobreexpresión de Her2.

Al estudiar la relación entre el porcentaje de células marcadas con Ki67 y el grado histológico, se observaron diferencias estadísticamente significativas, demostrando que los carcinomas con proliferación elevada eran mayoritariamente pobremente diferenciados.

En la relación entre Ki67 y receptores hormonales, también se advirtieron diferencias estadísticamente significativas, con los casos receptores hormonales positivos en mayor porcentaje en el grupo de baja proliferación. Esta relación entre la existencia de expresión y una baja proliferación se advirtió tanto con receptores de estrógenos como con receptores de progesterona, con altos niveles de significación.

Igualmente, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la relación entre Ki67 y Her2. Los casos Her2 negativos ocurrieron en mayor porcentaje en el grupo de baja proliferación.

A tenor de las correlaciones con los parámetros inmunohistoquímicos, es consecuente con ello la relación observada entre la proliferación celular y el subtipo molecular subrogado inmunohistoquímico, en la que se asoció una proliferación elevada a subtipos no Luminales, preferentemente basal, mientras que el subtipo Luminal A se encontraba generalmente asociado a un bajo nivel de proliferación.

A pesar de todo ello, no hemos observado en nuestra serie relación entre la proliferación celular cuantificada con inmunohistoquímica de Ki67 y la supervivencia, para ningún de

los umbrales considerados (14%, 20% y 40%), ni considerando subgrupos como ganglios afectados y no afectados. Únicamente, en el subgrupo de ganglios negativos, con un umbral del 20%, se observó, de forma significativa, una mejor supervivencia para los casos con índice de proliferación elevado.

En relación con esta ausencia de valor pronóstico, tampoco se encontró relación estadísticamente significativa entre Ki67 y el tamaño tumoral, la afectación ganglionar, y el estadio clínico.

Sin embargo, son bastantes los trabajos que apoyan el valor pronóstico de Ki67. Shandiz FH y cols,¹⁸² en un estudio de 106 casos de cáncer de mama, consideraron que el Ki67 es un factor de pronóstico independiente para la supervivencia en las pacientes con cáncer de mama. Acevedo F y cols,¹⁸³ en un estudio de 133 casos de cáncer de mama, concluyeron que un Ki67 elevado se asocia a peor pronóstico y es un factor predictor independiente. Thangarajah F y cols,¹⁸⁴ en un estudio de 800 casos de cáncer de mama, analizaron el papel del Ki67 como biomarcador de diagnóstico y pronóstico, constatando que el Ki67 es importante para distinguir entre los subtipos luminal A y luminal B en casos Her2 negativos, y por tanto, tiene un impacto pronóstico en pacientes con tumores hormonales positivos y Her2 negativo. Tashima R y cols,¹⁸⁵ en un estudio de 4329 pacientes con cáncer de mama, concluyen que el índice Ki67 es un biomarcador importante como indicador de proliferación celular en carcinomas y se considera un factor pronóstico eficaz para el cáncer de mama.

No obstante, en la metanálisis realizada por Stuart-Harris R y cols, existe un 20% de series en las que no se encuentra relación del Ki67 con la supervivencia.¹⁸⁶ Una de las causas de esta falta de unanimidad es probablemente la ausencia de acuerdo en la

definición del umbral que separe los tumores en baja y alta proliferación, así como la dificultad de establecer criterios homogéneos para la realización del conteo de células marcadas. Pero también, como demuestran Ács B y cols,¹⁸⁷ existen considerables diferencias en la capacidad para detectar células tumorales proliferantes entre diferentes anticuerpos que detectan Ki67 y este hecho añade una notable dificultad para diferenciar los grupos de pacientes con carcinomas de mama de bajo y alto riesgo.

➤ **TELOMERASA COMO MARCADOR DE CÁNCER DE MAMA**

La transcriptasa humana inversa de la telomerasa (hTERT), juega un papel importante en la senescencia celular pero también en la tumorigénesis. Se considera que alrededor del 85% de las células cancerosas muestran actividad de la telomerasa, que rara vez es detectable en las células somáticas. Yongxin Wu y cols,¹⁸⁸ consideran que TERT se expresa en el 80-90% de los tumores humanos, y en la mayoría de las células cancerosas, pero no en la mayoría de los tejidos normales y células somáticas, siendo un biomarcador prometedor para el diagnóstico temprano, clasificación molecular, evaluación del pronóstico, y desarrollo terapéutico para el cáncer. En base a este hecho, la utilidad de la telomerasa como marcador tumoral ha sido ampliamente investigada en carcinomas de diversas localizaciones.

Vinagre J y cols,¹⁸⁹ en sus estudios, encontraron la presencia de mutaciones en el promotor TERT en cánceres del sistema nervioso central (43%), vejiga (59%), tiroides (10%) y melanoma (29%).

Wang X y cols,¹⁹⁰ en un estudio de 53 casos con carcinoma de la vejiga y 26 casos con carcinoma de la próstata, concluyeron incluso que las mutaciones del promotor TERT

son de utilidad en el diagnóstico diferencial entre los carcinomas de la vejiga y los carcinomas de la próstata.

Castelo-Branco P y cols,^{107,131,177} recientemente han identificado un área específica en el promotor TERT, denominada THOR (*“TERT Hypermethylated Oncological Region”*), que está hipermetilada sólo en cánceres que expresan TERT y no está hipermetilada en los tejidos normales. Estos autores constataron que THOR puede predecir la evolución y la progresión tumoral en varios subgrupos de cánceres pediátricos. En el cáncer de próstata, sus hallazgos confirman que THOR tiene validez diagnóstica no solo para diferenciar el tejido prostático neoplásico del normal, sino también como marcador pronóstico del adenocarcinoma prostático.

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido comprobar el valor de la hipermetilación de una región promotora de la Telomerasa (THOR) como marcador específico de malignidad. En nuestro estudio, se han constatado valores de metilación de ADN menores al 20% en todos los casos de tejido mamario normal, mientras el 93,75% de los casos de cáncer de mama invasivo, tuvieron valores de hipermetilación superiores a ese 20%, lo que apoya la validez de esta determinación como marcador de neoplasia maligna, por su elevada sensibilidad y completa especificidad.

Estos resultados están en sintonía con los del Centro de Caracterización del Genoma de la Universidad Johns Hopkins y de la Universidad del Sur de California TCGA,^{107,191,192,193,194,195} realizados con la Plataforma de Secuenciación de ARN Illumina HiSeq 2000, y del Centro de Caracterización Genómica TCGA de la Universidad de Carolina del Norte^{177,191,192,193,194,195} que demuestran que el gen de la transcriptase inversa de la telomerasa (TERT) está hipermetilado y sobreexpresado en

el cáncer de mama, poniendo de relieve la utilidad y importancia de la metilación de ADN telomerasa como marcador tumoral en el cáncer de mama.^{196,197,198} Otros varios estudios demuestran la positividad de hTERT entre 50 y 90% en el cáncer de mama, mientras que no observan actividad en las células normales de tejido mamario.^{63,105,199,200,201,202} En una serie de 102 lesiones mamarias malignas y 20 tejidos mamarios sanos, Kulic y cols¹⁴⁷ demostraron que la actividad de la telomerasa en el cáncer de mama es significativamente mayor en comparación con la actividad en el tejido mamario normal, en consonancia con nuestros hallazgos.

➤ **TELOMERASA COMO FACTOR PRONÓSTICO EN CÁNCER DE MAMA**

Además de como marcador tumoral, la actividad de la telomerasa también ha sido analizada por su posible valor pronóstico en diversos tipos de cáncer, observándose generalmente que la expresión de TERT se correlaciona positivamente con la progresión del tumor, lo que sugiere que los niveles de TERT determinan la agresividad en el cáncer.⁶³

Castelo-Branco P y cols,^{107,131,177} observaron que la regulación de genes epigenéticos a través de la metilación del ADN se asocia con el pronóstico en múltiples cánceres, incluyendo el de cerebro y el cáncer de próstata.

En el carcinoma gástrico se ha demostrado, mediante análisis de la metilación del promotor TERT, que, además de la afectación ganglionar, la metilación de TERT es el único factor relacionado con la supervivencia global, tanto en análisis univariado como multivariado, por lo que los autores proponen su análisis como factor pronóstico en estos pacientes. Además, se encontró correlación con la extensión tumoral (T) y la afectación ganglionar (N), así como a la invasión linfovascular o neural, lo que sugiere

que una elevada actividad de telomerasa contribuye a la invasión de la pared gástrica y a la aparición de metástasis en ganglios.¹⁸⁸

Wang X y cols,¹⁹⁰ en un estudio de 17 pacientes con carcinoma urotelial sarcomatoide del tracto urinario superior también concluyeron que la presencia de mutaciones en el promotor de TERT es un factor de mal pronóstico. Yongxin Wu y cols,¹⁸⁸ consideran que la actividad de la telomerasa se observa en aproximadamente el 90% de todos los tumores malignos y que su detección puede predecir mal pronóstico en meningiomas, carcinomas hepatocelulares, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama y neuroblastomas.

Diversos autores han observado también utilidad pronóstica en la determinación de la actividad telomerasa en tumores de otras varias localizaciones como en neuroblastomas, cáncer de ovario y cáncer de cuello uterino.^{107,188,203}

Robert Bell y cols,²⁰⁴ refieren que las mutaciones descubiertas en el promotor TERT se encuentran entre las alteraciones genéticas más comunes observadas en múltiples tipos de cáncer, revelando un mecanismo biológico potencialmente causal que aumenta la actividad de la telomerasa en los tumores.^{205,206} Específicamente, una de las dos posiciones, G228A o G250A, está mutada en el 20% de los meduloblastomas, el 44% de los carcinomas hepatocelulares, el 66% de los carcinomas uroteliales de la vejiga, el 71% de los melanomas y el 83% de los glioblastomas; lo que las convierte en las mutaciones de un solo nucleótido más recurrentes observadas en estos tipos de cáncer. Tanto las mutaciones G228A como G250A están asociadas con una mayor expresión de TERT y actividad de la telomerasa, y tienen poder pronóstico en el cáncer de la vejiga y en los glioblastomas.

Tanto el acortamiento del telómero como la activación de la telomerasa se han estudiado también en el cáncer de mama y se han correlacionado con mal pronóstico. Ceja-Rangel y cols,²⁰⁷ consideran que la longitud del telómero y la actividad de la telomerasa son dos biomarcadores útiles como factores de pronóstico, en la evaluación de la capacidad invasiva y la agresividad de las células tumorales de pacientes con cáncer de mama.

Hoos A y cols,²⁰⁸ en un estudio retrospectivo de 25 pacientes con cáncer de mama, encontraron una correlación significativa entre la actividad enzimática y el tamaño del tumor, el estado de los ganglios linfáticos y el estadio, además de una asociación entre el aumento de telomerasa y la progresión tumoral.

En su serie de 102 lesiones mamarias malignas y 20 tejidos mamarios sanos, Kulic y cols,¹⁹⁹ demostraron que los pacientes de cáncer de mama con mayor actividad de telomerasa tuvieron una supervivencia libre de enfermedad y una supervivencia global a 10 años significativamente menor que aquellos con actividad de telomerasa más baja.

Sin embargo, en otros estudios de carcinoma de mama no se ha constatado la utilidad pronóstica de la telomerasa. Mokbel K y cols,²⁰⁹ en un estudio de 45 casos de carcinoma de mama, compararon la actividad de la telomerasa con datos clínicopatológicos y no encontraron diferencias significativas en la tasa de supervivencia global ni en la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años.

Otros autores, como Lingeng Lu y cols,¹⁴⁴ en un estudio de 348 casos de carcinoma de mama, asocian la validez pronóstica de la telomerasa al tipo de tratamiento administrado. Mientras que los pacientes tratados con quimioterapia con alta expresión

de telomerasa respondieron mal a la quimioterapia y tuvieron resultados desfavorables en términos de supervivencia global y libre de enfermedad, no se constató este hecho en los casos tratados con terapia endocrina, en los cuales, por el contrario, la supervivencia mejoró. En las pacientes tratadas con quimioterapia seguida de terapia endocrina, no se registraron diferencias en la supervivencia de las pacientes, independientemente de existir una alta o baja expresión de la telomerasa. Estos hallazgos sugieren que la relevancia pronóstica de actividad de la telomerasa puede estar en relación con la elección del tratamiento adyuvante en el cáncer de mama.

La relación entre los niveles de actividad telomerasa y otros parámetros pronósticos en el cáncer de mama ha sido también abordada en el estudio de Kulic y cols,¹⁹⁹ en el que se correlacionaron positivamente con el tamaño del tumor, el estado de los ganglios axilares, el grado histológico, la expresión de Her2 y la proliferación celular con Ki67, aunque no con receptores de estrógenos o progesterona o la edad de los pacientes. Sin embargo, el estudio de Lingeng Lu y cols,¹⁴⁴ encontró una asociación con el tamaño del tumor, pero no con la afectación de ganglios linfáticos o el estado del receptor hormonal. Los autores describen que los pacientes con hipermetilación de THOR fueron más propensos a tener enfermedad en estadio III, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Estos resultados están en acuerdo con los de Salhab M y cols,²¹⁰ que tampoco encontraron asociación de la telomerasa con el estadio clínico, ni con el grado tumoral; aunque las pacientes con tumores de grado 3 parecían tener una mayor expresión de telomerasa, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Recientemente, se han comunicado evidencias de que la longitud de los telómeros está asociada con el tamaño del tumor, la metástasis de los ganglios linfáticos, el grado histológico y subtipos de tumores mamarios específicos. Los telómeros más cortos en el tejido tumoral se han relacionado con subtipos más agresivos, incluyendo tumores Luminal B, HER2 y *Basal Like*. Otros estudios han demostrado una reducción de la longitud de los telómeros en los tumores mamarios de grado 3 y correlación con la aneuploidía, la existencia de metástasis en ganglios linfáticos y estadios más elevados.

No obstante, Jing Shen y cols,²¹¹ en un amplio estudio prospectivo de cáncer de mama con 1.026 pacientes y un tiempo de seguimiento de hasta 9,4 años, no observaron correlación significativa entre la longitud de los telómeros y la supervivencia general del cáncer de mama. Únicamente, la mayor longitud de los telómeros se asoció significativamente con peor pronóstico para el subgrupo Her2.

En nuestro estudio, se consideró únicamente el umbral del 40% por tener una distribución más homogénea entre las pacientes. Con los umbrales de 15% o 20%, que diferenciaban tejido tumoral de normal, la gran mayoría de los carcinomas pertenecían al grupo de hipermetilados, lo que imposibilitaba cualquier comparación estadística.

Teniendo en cuenta el umbral de 40%, no se observó relación estadísticamente significativa entre THOR con el tamaño tumoral, tipo histológico (ductal vs no ductal), grado histológico, invasión vascular, afectación ganglionar, estadio, receptores hormonales, Her2 o el subtipo molecular.

En el estudio de supervivencia, tampoco observamos diferencias significativas entre los carcinomas con o sin hipermetilación (umbral 40%), tanto si consideramos la población

general, como cuando se analizó en poblaciones diferenciadas (con ganglios afectados o no, tamaño tumoral mayor y menor de 2 cm, subtipo Luminal). Únicamente, en el subgrupo de tumores “No-luminales” se registraron diferencias estadísticas significativas en las curvas de supervivencia, indicando una mayor supervivencia en pacientes con carcinomas con THOR elevado.

A excepción de esta última característica, los resultados de nuestra serie de carcinomas de mama no apoyan el carácter pronóstico de la actividad telomerasa, ni su relación con otros parámetros clásicos pronósticos en el cáncer mamario. A la vista de estos hallazgos y de lo expuesto en la literatura, consideramos que se trata de un tema controvertido que precisa de una investigación más amplia, con cohortes de pacientes más numerosas.

En relación a nuestro hallazgo de una mayor supervivencia en pacientes con THOR elevado y subtipo “No-luminal”, los resultados podrían estar relacionados con el estudio de Lingeng Lu y cols,¹⁴⁴ en el que se observó una relación entre alta expresión de telomerasa y menor supervivencia en pacientes tratados con quimioterapia, y mayor en los casos tratados con terapia endocrina, considerando que en los tumores “No-luminales” se utiliza la quimioterapia pero no tratamiento hormonal. No obstante, los resultados serían de signo contrario a los de estos autores.

➤ **TELOMERASA Y PROLIFERACIÓN CELULAR**

Los resultados de diversos estudios reflejados en la literatura, parecen indicar que la actividad de la telomerasa está frecuentemente asociada con la proliferación celular y sugiere que puede haber regulación en algunos tipos de tejidos y células. Greider CW y

cols,¹⁴⁹ concluyeron que la telomerasa podría ser un mejor marcador que Ki67, MIB1, o otros marcadores de proliferación en el diagnóstico del cáncer.

En el estudio de Hoos A y cols,²⁰⁸ en su estudio en cáncer de mama, además de la relación entre telomerasa y otros factores pronósticos, se analizó también la actividad de la telomerasa en tumores tratados con quimioterapia y no tratados, observándose sin excepción, que la actividad de la telomerasa se redujo fuertemente en todos los tumores tratados con quimioterapia en comparación con los tumores no tratados. De ello se puede deducir que la actividad de la telomerasa se asocia o parece reflejar los efectos anti-proliferativos de la quimioterapia, por lo que concluyen que la telomerasa es un factor importante para el control de la capacidad de proliferación celular

En nuestro estudio, no observamos relación estadísticamente significativa entre THOR (umbral de 40%) y proliferación celular medida con Ki67, tanto si utilizábamos el umbral del 14%, del 20% o del 40%. Por tanto, de nuestros resultados no se puede inferir la existencia de relación entre la hipermetilación de ADN de telomerasa y la proliferación celular.

VI. CONCLUSIONES

Primera. La determinación de la hipermetilación de THOR en tejido de cáncer de mama es una prueba útil como marcador de neoplasia maligna invasiva, con un elevado nivel de sensibilidad y especificidad. La posibilidad de realizarse en tejido incluido en parafina permite su aplicación en el diagnóstico histopatológico habitual.

Segunda. Los resultados de este estudio no permiten establecer una relación entre actividad telomerasa, utilizando THOR como marcador, con parámetros pronósticos clínico-patológicos clásicos como el tamaño, el grado histopatológico o la afectación ganglionar. Tampoco demuestra la existencia de diferencias en la actividad telomerasa de carcinomas con diferente expresión de receptores hormonales, de Her2 o con subtipo molecular distinto.

Tercera. La proliferación celular cuantificada mediante inmunohistoquímica de Ki67, se asocia a parámetros relacionados con la agresividad tumoral en el cáncer de mama, como el grado histológico alto, la ausencia de receptores hormonales, la expresión de Her2 o el subtipo molecular no-Luminal. Sin embargo, no se ha encontrado relación alguna con el tamaño tumoral, la afectación ganglionar, el estadio tumoral o la supervivencia de las pacientes.

Cuarta. No se ha demostrado, en nuestra serie, la existencia de relación entre la actividad telomerasa y el nivel de proliferación celular medido con Ki67, que posiblemente se encuentre más influenciado por la expresión de otros genes con función hormonal o de factor de crecimiento.

Quinta. La actividad telomerasa no presenta relevancia pronóstica en el conjunto global del carcinoma de mama, aunque podría ser de utilidad en el grupo de pacientes con subtipo molecular no-Luminal.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Hwang K-T, Han W, Kim J, et al. Prognostic Influence of BCL2 on Molecular Subtypes of Breast Cancer. *J Breast Cancer*. 2017;20(1):54-64. doi:10.4048/jbc.2017.20.1.54.
2. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn H-J. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2011;22(8):1736-1747. doi:10.1093/annonc/mdr304.
3. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2013;24(9):2206-2223. doi:10.1093/annonc/mdt303.
4. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, et al. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2015;26(8):1533-1546. doi:10.1093/annonc/mdv221.
5. Cejalvo JM, Martinez de Duenas E, Galvan P, et al. Intrinsic Subtypes and Gene Expression Profiles in Primary and Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res*. 2017;77(9):2213-2221. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2717.
6. Heng YJ, Lester SC, Tse GM, et al. The molecular basis of breast cancer pathological phenotypes. *J Pathol*. 2017;241(3):375-391. doi:10.1002/path.4847.
7. Wallden B, Storhoff J, Nielsen T, et al. Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Med Genomics*. 2015;8:54. doi:10.1186/s12920-015-0129-6.
8. Cheang MCU, Martin M, Nielsen TO, et al. Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. *Oncologist*. 2015;20(5):474-482. doi:10.1634/theoncologist.2014-0372.
9. Tobin NP, Harrell JC, Lovrot J, et al. Molecular subtype and tumor characteristics of breast cancer metastases as assessed by gene expression significantly influence patient post-relapse survival. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2015;26(1):81-88. doi:10.1093/annonc/mdu498.
10. Martin M, Prat A, Rodriguez-Lescure A, et al. PAM50 proliferation score as a predictor of weekly paclitaxel benefit in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;138(2):457-466. doi:10.1007/s10549-013-2416-2.
11. Bastien RRL, Rodriguez-Lescure A, Ebbert MTW, et al. PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC Med Genomics*. 2012;5:44. doi:10.1186/1755-8794-5-44.
12. Prat A, Parker JS, Fan C, Perou CM. PAM50 assay and the three-gene model for identifying the major and clinically relevant molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;135(1):301-306. doi:10.1007/s10549-012-2143-0.
13. Chia SK, Bramwell VH, Tu D, et al. A 50-gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res*. 2012;18(16):4465-4472. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0286.
14. Nielsen TO, Parker JS, Leung S, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in



- tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(21):5222-5232. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1282.
15. Dunbier AK, Anderson H, Ghazoui Z, et al. Association between breast cancer subtypes and response to neoadjuvant anastrozole. *Steroids.* 2011;76(8):736-740. doi:10.1016/j.steroids.2011.02.025.
 16. Benevolenskaya E V, Islam ABMMK, Ahsan H, et al. DNA methylation and hormone receptor status in breast cancer. *Clin Epigenetics.* 2016;8:17. doi:10.1186/s13148-016-0184-7.
 17. Minatani N, Waraya M, Yamashita K, et al. Prognostic Significance of Promoter DNA Hypermethylation of cysteine dioxygenase 1 (CDO1) Gene in Primary Breast Cancer. *PLoS One.* 2016;11(1):e0144862. doi:10.1371/journal.pone.0144862.
 18. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108. doi:10.3322/caac.21262.
 19. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(1):5-29. doi:10.3322/caac.21254.
 20. International Agency for Research on Cancer. World Cancer report 2008. *Cancer Control.* 2008;199:512. doi:10.1016/j.cma.2010.02.010.
 21. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol.* 2008;9(8):730-756. doi:10.1016/S1470-2045(08)70179-7.
 22. Andre MR, Amaral S, Mayer A, Miranda A. Breast cancer patients survival and associated factors: reported outcomes from the Southern Cancer Registry in Portugal. *Acta Med Port.* 2014;27(3):325-330.
 23. Sanchez-Munoz A, Gallego E, de Luque V, et al. Lack of evidence for KRAS oncogenic mutations in triple-negative breast cancer. *BMC Cancer.* 2010;10:136. doi:10.1186/1471-2407-10-136.
 24. Yang F, Li Y, Xu L, et al. miR-17 as a diagnostic biomarker regulates cell proliferation in breast cancer. *Onco Targets Ther.* 2017;10:543-550. doi:10.2147/OTT.S127723.
 25. Perez-Rivas LG, Jerez JM, Carmona R, et al. A microRNA signature associated with early recurrence in breast cancer. *PLoS One.* 2014;9(3):e91884. doi:10.1371/journal.pone.0091884.
 26. Prat A, Galvan P, Jimenez B, et al. Prediction of Response to Neoadjuvant Chemotherapy Using Core Needle Biopsy Samples with the Prosigna Assay. *Clin Cancer Res.* 2016;22(3):560-566. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0630.
 27. Valla M, Engstrom MJ, Ytterhus B, et al. FGD5 amplification in breast cancer patients is associated with tumour proliferation and a poorer prognosis. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;162(2):243-253. doi:10.1007/s10549-017-4125-8.
 28. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
 29. Romero Q, Bendahl P-O, Ferno M, Grabau D, Borgquist S. A novel model for Ki67 assessment in breast cancer. *Diagn Pathol.* 2014;9:118. doi:10.1186/1746-1596-9-118.
 30. Lee LH, Yang H, Bigras G. Current breast cancer proliferative markers correlate variably based on decoupled duration of cell cycle phases. *Sci Rep.* 2014;4:5122. doi:10.1038/srep05122.
 31. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer:



- recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(22):1656-1664. doi:10.1093/jnci/djr393.
32. Untch M, Harbeck N, Huober J, et al. Primary Therapy of Patients with Early Breast Cancer: Evidence, Controversies, Consensus: Opinions of German Specialists to the 14th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2015 (Vienna 2015). *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2015;75(6):556-565. doi:10.1055/s-0035-1546120.
 33. Besusparis J, Plancoulaine B, Rasmusson A, et al. Impact of tissue sampling on accuracy of Ki67 immunohistochemistry evaluation in breast cancer. *Diagn Pathol.* 2016;11(1):82. doi:10.1186/s13000-016-0525-z.
 34. Ribelles N, Perez-Villa L, Jerez JM, et al. Pattern of recurrence of early breast cancer is different according to intrinsic subtype and proliferation index. *Breast Cancer Res.* 2013;15(5):R98. doi:10.1186/bcr3559.
 35. Harley CB, Kim NW, Prowse KR, et al. Telomerase, cell immortality, and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1994;59:307-315.
 36. Rhyu MS. Telomeres, telomerase, and immortality. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(12):884-894.
 37. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature.* 1991;350(6319):569-573. doi:10.1038/350569a0.
 38. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res.* 1991;256(2-6):271-282.
 39. Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet.* 1997;17(2):231-235. doi:10.1038/ng1097-231.
 40. van Steensel B, de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature.* 1997;385(6618):740-743. doi:10.1038/385740a0.
 41. Liu L, Li H, Zhang M, Lv X. Effects of targeted nano-delivery systems combined with hTERT-siRNA and Bmi-1-siRNA on MCF-7 cells. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(6):6674-6682.
 42. Martinez P, Blasco MA. Replicating through telomeres: a means to an end. *Trends Biochem Sci.* 2015;40(9):504-515. doi:10.1016/j.tibs.2015.06.003.
 43. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 2005;19(18):2100-2110. doi:10.1101/gad.1346005.
 44. Benetti R, Schoeftner S, Munoz P, Blasco MA. Role of TRF2 in the assembly of telomeric chromatin. *Cell Cycle.* 2008;7(21):3461-3468. doi:10.4161/cc.7.21.7013.
 45. Blasco MA. Mouse models to study the role of telomeres in cancer, aging and DNA repair. *Eur J Cancer.* 2002;38(17):2222-2228.
 46. Munoz P, Blanco R, de Carcer G, et al. TRF1 controls telomere length and mitotic fidelity in epithelial homeostasis. *Mol Cell Biol.* 2009;29(6):1608-1625. doi:10.1128/MCB.01339-08.
 47. Tejera AM, Stagno d'Alcontres M, Thanasoula M, et al. TPP1 is required for TERT recruitment, telomere elongation during nuclear reprogramming, and normal skin development in mice. *Dev Cell.* 2010;18(5):775-789. doi:10.1016/j.devcel.2010.03.011.
 48. de Lange T. T-loops and the origin of telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(4):323-329. doi:10.1038/nrm1359.
 49. Oztas E, Kara H, Kara ZP, Aydogan MU, Uras C, Ozhan G. Association



- Between Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene Variations and Risk of Developing Breast Cancer. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2016;20(8):459-464. doi:10.1089/gtmb.2015.0339.
50. Canela A, Vera E, Klatt P, Blasco MA. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(13):5300-5305. doi:10.1073/pnas.0609367104.
 51. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990;345(6274):458-460. doi:10.1038/345458a0.
 52. Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene*. 2002;21(4):564-579. doi:10.1038/sj.onc.1205083.
 53. Liu L, Bailey SM, Okuka M, et al. Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol*. 2007;9(12):1436-1441. doi:10.1038/ncb1664.
 54. Harrington L. Does the reservoir for self-renewal stem from the ends? *Oncogene*. 2004;23(43):7283-7289. doi:10.1038/sj.onc.1207948.
 55. Kim W, Ludlow AT, Min J, et al. Regulation of the Human Telomerase Gene TERT by Telomere Position Effect-Over Long Distances (TPE-OLD): Implications for Aging and Cancer. *PLoS Biol*. 2016;14(12):e2000016. doi:10.1371/journal.pbio.2000016.
 56. Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, et al. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet*. 1997;17(4):498-502. doi:10.1038/ng1297-498.
 57. Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L. Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol*. 1998;8(3):177-180.
 58. Lewis KA, Tollefsbol TO. Regulation of the Telomerase Reverse Transcriptase Subunit through Epigenetic Mechanisms. *Front Genet*. 2016;7:83. doi:10.3389/fgene.2016.00083.
 59. Benetti R, Garcia-Cao M, Blasco MA. Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres. *Nat Genet*. 2007;39(2):243-250. doi:10.1038/ng1952.
 60. Blasco MA. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet*. 2007;8(4):299-309. doi:10.1038/nrg2047.
 61. Schoeftner S, Blasco MA. Chromatin regulation and non-coding RNAs at mammalian telomeres. *Semin Cell Dev Biol*. 2010;21(2):186-193. doi:10.1016/j.semcdb.2009.09.015.
 62. Schoeftner S, Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol*. 2008;10(2):228-236. doi:10.1038/ncb1685.
 63. Simsek BC, Turk BA, Ozen F, Tuzcu M, Kanter M. Investigation of telomerase activity and apoptosis on invasive ductal carcinoma of the breast using immunohistochemical and Western blot methods. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(16):3089-3099.
 64. Hrdlickova R, Nehyba J, Bose HRJ. Alternatively spliced telomerase reverse transcriptase variants lacking telomerase activity stimulate cell proliferation. *Mol Cell Biol*. 2012;32(21):4283-4296. doi:10.1128/MCB.00550-12.
 65. de Lange T. How telomeres solve the end-protection problem. *Science*. 2009;326(5955):948-952. doi:10.1126/science.1170633.
 66. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. 1985;43(2 Pt 1):405-413.



67. Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*. 1989;59(3):521-529.
68. Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)*. 1997;62(11):1180-1190.
69. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*. 1990;346(6287):866-868. doi:10.1038/346866a0.
70. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(21):10114-10118.
71. Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(21):9857-9860.
72. Bernardes de Jesus B, Vera E, Schneeberger K, et al. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med*. 2012;4(8):691-704. doi:10.1002/emmm.201200245.
73. Taga S, Osaki T, Ohgami A, Imoto H, Yasumoto K. Prognostic impact of telomerase activity in non-small cell lung cancers. *Ann Surg*. 1999;230(5):715-720.
74. Marchetti A, Bertacca G, Buttitta F, et al. Telomerase activity as a prognostic indicator in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 1999;5(8):2077-2081.
75. Patel PL, Suram A, Mirani N, Bischof O, Herbig U. Derepression of hTERT gene expression promotes escape from oncogene-induced cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(34):E5024-33. doi:10.1073/pnas.1602379113.
76. Ozturk MB, Li Y, Tergaonkar V. Current Insights to Regulation and Role of Telomerase in Human Diseases. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2017;6(1). doi:10.3390/antiox6010017.
77. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
78. Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, et al. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med*. 1999;5(10):1164-1170. doi:10.1038/13495.
79. Herbert B, Pitts AE, Baker SI, et al. Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(25):14276-14281.
80. Shamas MA, Simmons CG, Corey DR, Shmookler Reis RJ. Telomerase inhibition by peptide nucleic acids reverses "immortality" of transformed human cells. *Oncogene*. 1999;18(46):6191-6200. doi:10.1038/sj.onc.1203069.
81. Khatrar E. Transcriptional Regulation of Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) by MYC. 2017;5(January):1-7. doi:10.3389/fcell.2017.00001.
82. Cassar L, Nicholls C, Pinto AR, et al. TGF-beta receptor mediated telomerase inhibition, telomere shortening and breast cancer cell senescence. *Protein Cell*. September 2016. doi:10.1007/s13238-016-0322-1.
83. Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med*. 2016;8(1):69. doi:10.1186/s13073-016-0324-x.
84. Heaphy CM, Subhawong AP, Gross AL, et al. Shorter telomeres in luminal B,



- HER-2 and triple-negative breast cancer subtypes. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc.* 2011;24(2):194-200. doi:10.1038/modpathol.2010.198.
85. Cassar L, Nicholls C, Pinto AR, et al. TGF-beta receptor mediated telomerase inhibition, telomere shortening and breast cancer cell senescence. *Protein Cell.* 2017;8(1):39-54. doi:10.1007/s13238-016-0322-1.
 86. Rudolph KL, Chang S, Lee HW, et al. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell.* 1999;96(5):701-712.
 87. Gonzalez-Suarez E, Samper E, Flores JM, Blasco MA. Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. *Nat Genet.* 2000;26(1):114-117. doi:10.1038/79089.
 88. Artandi SE, Chang S, Lee SL, et al. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature.* 2000;406(6796):641-645. doi:10.1038/35020592.
 89. Wazir U, Newbold RF, Jiang WG, Sharma AK, Mokbel K. Prognostic and therapeutic implications of mTORC1 and Rictor expression in human breast cancer. *Oncol Rep.* 2013;29(5):1969-1974. doi:10.3892/or.2013.2346.
 90. Gao W, Shi Y, Liu W, et al. Diagnostic Value of Methylated Human Telomerase Reverse Transcriptase in Human Cancers: A Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2015;5:296. doi:10.3389/fonc.2015.00296.
 91. Khosravi-Maharlooei M, Jaberipour M, Hosseini Tashnizi A, Attar A, Amirmoezi F, Habibagahi M. Expression Pattern of Alternative Splicing Variants of Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) in Cancer Cell Lines Was not Associated with the Origin of the Cells. *Int J Mol Cell Med.* 2015;4(2):109-119.
 92. Khatrar E, Kumar P, Liu CY, et al. Telomerase reverse transcriptase promotes cancer cell proliferation by augmenting tRNA expression. *J Clin Invest.* 2016;126(10):4045-4060. doi:10.1172/JCI86042.
 93. Zhou J, Ding D, Wang M, Cong Y-S. Telomerase reverse transcriptase in the regulation of gene expression. *BMB Rep.* 2014;47(1):8-14.
 94. Perkins ND. The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(2):121-132. doi:10.1038/nrc3204.
 95. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol.* 2011;12(8):695-708. doi:10.1038/ni.2065.
 96. Faleiro I, Leao R, Binnie A, Andrade de Mello R, Maia A-T, Castelo-Branco P. Epigenetic therapy in urologic cancers: an update on clinical trials. *Oncotarget.* December 2016. doi:10.18632/oncotarget.14226.
 97. Ting AH, McGarvey KM, Baylin SB. The cancer epigenome--components and functional correlates. *Genes Dev.* 2006;20(23):3215-3231. doi:10.1101/gad.1464906.
 98. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(2):89-97. doi:10.1016/j.tibs.2005.12.008.
 99. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(2):143-153. doi:10.1038/nrc1279.
 100. Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2005;2 Suppl 1:S4-11. doi:10.1038/ncponc0354.
 101. Khare SP, Habib F, Sharma R, Gadewal N, Gupta S, Galande S. Histome--a relational knowledgebase of human histone proteins and histone modifying



- enzymes. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Database issue):D337-42. doi:10.1093/nar/gkr1125.
102. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007;8(4):286-298. doi:10.1038/nrg2005.
 103. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008;358(11):1148-1159. doi:10.1056/NEJMra072067.
 104. Tang Q, Cheng J, Cao X, Surowy H, Burwinkel B. Blood-based DNA methylation as biomarker for breast cancer: a systematic review. *Clin Epigenetics.* 2016;8:115. doi:10.1186/s13148-016-0282-6.
 105. Masood S, El-Gabry E, Zhang C, Wang Z. The potential of identification of a malignancy-associated biomarker in breast cancer diagnosis and research: hTERT gene DNA methylation. *Diagn Cytopathol.* 2016;44(8):670-675. doi:10.1002/dc.23505.
 106. Akincilar SC, Unal B, Tergaonkar V. Reactivation of telomerase in cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(8):1659-1670. doi:10.1007/s00018-016-2146-9.
 107. Castelo-Branco P, Choufani S, Mack S, et al. Methylation of the TERT promoter and risk stratification of childhood brain tumours: an integrative genomic and molecular study. *Lancet Oncol.* 2013;14(6):534-542. doi:10.1016/S1470-2045(13)70110-4.
 108. Arita H, Narita Y, Takami H, et al. TERT promoter mutations rather than methylation are the main mechanism for TERT upregulation in adult gliomas. *Acta Neuropathol.* 2013;126(6):939-941. doi:10.1007/s00401-013-1203-9.
 109. Bernardes de Jesus B, Schneeberger K, Vera E, Tejera A, Harley CB, Blasco MA. The telomerase activator TA-65 elongates short telomeres and increases health span of adult/old mice without increasing cancer incidence. *Aging Cell.* 2011;10(4):604-621. doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00700.x.
 110. Holysz H, Lipinska N, Paszel-Jaworska A, Rubis B. Telomerase as a useful target in cancer fighting-the breast cancer case. *Tumour Biol.* 2013;34(3):1371-1380. doi:10.1007/s13277-013-0757-4.
 111. Ivancich M, Schrank Z, Wojdyla L, et al. Treating Cancer by Targeting Telomeres and Telomerase. *Antioxidants (Basel, Switzerland).* 2017;6(1). doi:10.3390/antiox6010015.
 112. Barczak W, Rozwadowska N, Romaniuk A, et al. Telomere length assessment in leukocytes presents potential diagnostic value in patients with breast cancer. *Oncol Lett.* 2016;11(3):2305-2309. doi:10.3892/ol.2016.4188.
 113. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994;266(5193):2011-2015.
 114. Liu X, Wang Y, Chang G, Wang F, Wang F, Geng X. Alternative Splicing of hTERT Pre-mRNA: A Potential Strategy for the Regulation of Telomerase Activity. *Int J Mol Sci.* 2017;18(3). doi:10.3390/ijms18030567.
 115. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer.* 1997;33(5):787-791. doi:10.1016/S0959-8049(97)00062-2.
 116. Avilion AA, Piatyszek MA, Gupta J, Shay JW, Bacchetti S, Greider CW. Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res.* 1996;56(3):645-650.
 117. Chadeneau C, Hay K, Hirte HW, Gallinger S, Bacchetti S. Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer*



- Res.* 1995;55(12):2533-2536.
118. Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(8):2900-2904.
 119. Engelhardt M, Albanell J, Drullinsky P, et al. Relative contribution of normal and neoplastic cells determines telomerase activity and telomere length in primary cancers of the prostate, colon, and sarcoma. *Clin Cancer Res.* 1997;3(10):1849-1857.
 120. Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, et al. Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res.* 1995;55(15):3258-3262.
 121. Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, et al. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(12):895-902.
 122. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med.* 1995;1(3):249-255.
 123. Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, et al. Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(2):116-122.
 124. Norrback KF, Dahlenborg K, Carlsson R, Roos G. Telomerase activation in normal B lymphocytes and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood.* 1996;88(1):222-229.
 125. Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J, Moore MA. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 1997;3(11):1931-1941.
 126. Engelhardt M, Ozkaynak MF, Drullinsky P, et al. Telomerase activity and telomere length in pediatric patients with malignancies undergoing chemotherapy. *Leukemia.* 1998;12(1):13-24.
 127. Engelhardt M, Mackenzie K, Drullinsky P, Silver RT, Moore MA. Telomerase activity and telomere length in acute and chronic leukemia, pre- and post-ex vivo culture. *Cancer Res.* 2000;60(3):610-617.
 128. Dalbagni G, Han W, Zhang ZF, et al. Evaluation of the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay for telomerase as a diagnostic modality in recurrent bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 1997;3(9):1593-1598.
 129. Da M-X, Wu X-T, Guo T-K, et al. Clinical significance of telomerase activity in peritoneal lavage fluid from patients with gastric cancer and its relationship with cellular proliferation. *World J Gastroenterol.* 2007;13(22):3122-3127.
 130. Kozziel JE, Herbert B-S. The telomerase inhibitor imetelstat alone, and in combination with trastuzumab, decreases the cancer stem cell population and self-renewal of HER2+ breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;149(3):607-618. doi:10.1007/s10549-015-3270-1.
 131. Castelo-Branco P, Zhang C, Lipman T, et al. Neural tumor-initiating cells have distinct telomere maintenance and can be safely targeted for telomerase inhibition. *Clin Cancer Res.* 2011;17(1):111-121. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2075.
 132. Chiappori AA, Kolevska T, Spigel DR, et al. A randomized phase II study of the telomerase inhibitor imetelstat as maintenance therapy for advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2015;26(2):354-362. doi:10.1093/annonc/mdu550.
 133. Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(3):167-179. doi:10.1038/nrc2275.



134. Asai A, Oshima Y, Yamamoto Y, et al. A novel telomerase template antagonist (GRN163) as a potential anticancer agent. *Cancer Res.* 2003;63(14):3931-3939.
135. Akiyama M, Hideshima T, Shammas MA, et al. Effects of oligonucleotide N3'-->P5' thio-phosphoramidate (GRN163) targeting telomerase RNA in human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 2003;63(19):6187-6194.
136. Makki J, Myint O, Wynn AA, Samsudin AT, John DV. Expression distribution of cancer stem cells, epithelial to mesenchymal transition, and telomerase activity in breast cancer and their association with clinicopathologic characteristics. *Clin Med Insights Pathol.* 2015;8:1-16. doi:10.4137/CPath.S19615.
137. Cong Y-S, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66(3):407-25, table of contents.
138. Kyo S, Inoue M. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: how can we apply them for cancer therapy? *Oncogene.* 2002;21(4):688-697. doi:10.1038/sj.onc.1205163.
139. Tollefsbol TO. Dietary epigenetics in cancer and aging. *Cancer Treat Res.* 2014;159:257-267. doi:10.1007/978-3-642-38007-5_15.
140. Devereux TR, Horikawa I, Anna CH, Annab LA, Afshari CA, Barrett JC. DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Cancer Res.* 1999;59(24):6087-6090.
141. Dessain SK, Yu H, Reddel RR, Beijersbergen RL, Weinberg RA. Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Res.* 2000;60(3):537-541.
142. Zinn RL, Pruitt K, Eguchi S, Baylin SB, Herman JG. hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site. *Cancer Res.* 2007;67(1):194-201. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3396.
143. Masood S, El-Gabry E, Zhang C, Wang Z. DNA Methylation of the hTERT Gene in Breast Cancer Revisited: Diagnostic and Clinical Implications. *Lab Med.* 2016;47(4):293-299. doi:10.1093/labmed/lmw043.
144. Lu L, Zhang C, Zhu G, et al. Telomerase expression and telomere length in breast cancer and their associations with adjuvant treatment and disease outcome. *Breast Cancer Res.* 2011;13(3):R56. doi:10.1186/bcr2893.
145. Poremba C, Heine B, Diallo R, et al. Telomerase as a prognostic marker in breast cancer: high-throughput tissue microarray analysis of hTERT and hTR. *J Pathol.* 2002;198(2):181-189. doi:10.1002/path.1191.
146. Elkak A, Mokbel R, Wilson C, Jiang WG, Newbold RF, Mokbel K. hTERT mRNA expression is associated with a poor clinical outcome in human breast cancer. *Anticancer Res.* 2006;26(6C):4901-4904.
147. Kulic A, Plavetic ND, Gamulin S, Jakic-Razumovic J, Vrbanec D, Sirotkovic-Skerlev M. Telomerase activity in breast cancer patients: association with poor prognosis and more aggressive phenotype. *Med Oncol.* 2016;33(3):23. doi:10.1007/s12032-016-0736-x.
148. Hoffmeyer K, Raggioli A, Rudloff S, et al. Wnt/beta-catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science.* 2012;336(6088):1549-1554. doi:10.1126/science.1218370.
149. Greider CW. Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(1):90-92.
150. Choi J, Southworth LK, Sarin KY, et al. TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental



- program. *PLoS Genet.* 2008;4(1):e10. doi:10.1371/journal.pgen.0040010.
151. Artandi SE, Alson S, Tietze MK, et al. Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(12):8191-8196. doi:10.1073/pnas.112515399.
 152. Gonzalez-Suarez E, Samper E, Ramirez A, et al. Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes. *EMBO J.* 2001;20(11):2619-2630. doi:10.1093/emboj/20.11.2619.
 153. Sarin KY, Cheung P, Gilson D, et al. Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. *Nature.* 2005;436(7053):1048-1052. doi:10.1038/nature03836.
 154. Stewart SA, Hahn WC, O'Connor BF, et al. Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(20):12606-12611. doi:10.1073/pnas.182407599.
 155. Li S, Rosenberg JE, Donjacour AA, et al. Rapid inhibition of cancer cell growth induced by lentiviral delivery and expression of mutant-template telomerase RNA and anti-telomerase short-interfering RNA. *Cancer Res.* 2004;64(14):4833-4840. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0953.
 156. Ghosh A, Saginc G, Leow SC, et al. Telomerase directly regulates NF-kappaB-dependent transcription. *Nat Cell Biol.* 2012;14(12):1270-1281. doi:10.1038/ncb2621.
 157. Ding D, Xi P, Zhou J, Wang M, Cong Y-S. Human telomerase reverse transcriptase regulates MMP expression independently of telomerase activity via NF-kappaB-dependent transcription. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2013;27(11):4375-4383. doi:10.1096/fj.13-230904.
 158. Park J-I, Venteicher AS, Hong JY, et al. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature.* 2009;460(7251):66-72. doi:10.1038/nature08137.
 159. Zhou J, Mao B, Zhou Q, et al. Endoplasmic reticulum stress activates telomerase. *Aging Cell.* 2014;13(1):197-200. doi:10.1111/accel.12161.
 160. Haendeler J, Drose S, Buchner N, et al. Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(6):929-935. doi:10.1161/ATVBAHA.109.185546.
 161. Indran IR, Hande MP, Pervaiz S. hTERT overexpression alleviates intracellular ROS production, improves mitochondrial function, and inhibits ROS-mediated apoptosis in cancer cells. *Cancer Res.* 2011;71(1):266-276. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1588.
 162. Kovalenko OA, Caron MJ, Ulema P, et al. A mutant telomerase defective in nuclear-cytoplasmic shuttling fails to immortalize cells and is associated with mitochondrial dysfunction. *Aging Cell.* 2010;9(2):203-219. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00551.x.
 163. Cong Y, Shay JW. Actions of human telomerase beyond telomeres. *Cell Res.* 2008;18(7):725-732. doi:10.1038/cr.2008.74.
 164. Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc).* 2010;75(13):1563-1583.
 165. Saha B, Chaiwun B, Tsao-Wei DD, et al. Telomerase and markers of cellular proliferation are associated with the progression of cervical intraepithelial



- neoplasia lesions. *Int J Gynecol Pathol.* 2007;26(3):214-222. doi:10.1097/01.pgp.0000250146.44592.d2.
166. Yeh TS, Chen TC, Chen MF. Dedifferentiation of human hepatocellular carcinoma up-regulates telomerase and Ki67 expression. *Arch Surg.* 2000;135(11):1334-1339.
 167. Li J, Huang X, Xie X, Wang J, Duan M. Human telomerase reverse transcriptase regulates cyclin D1 and G1/S phase transition in laryngeal squamous carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 2011;131(5):546-551. doi:10.3109/00016489.2011.557393.
 168. Wu K, Volke A, Lund M, Bang K, Thestrup-Pedersen K. Telomerase activity is spontaneously increased in lymphocytes from patients with atopic dermatitis and correlates with cellular proliferation. *J Dermatol Sci.* 1999;22(1):24-30.
 169. Jang HS, Oh CK, Jo JH, Kim YS, Kwon KS. Detection of telomerase activity in psoriasis lesional skin and correlation with Ki67 expression and suppression by retinoic acid. *J Korean Med Sci.* 2001;16(5):623-629. doi:10.3346/jkms.2001.16.5.623.
 170. Mukherjee S, Firpo EJ, Wang Y, Roberts JM. Separation of telomerase functions by reverse genetics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(50):E1363-71. doi:10.1073/pnas.1112414108.
 171. Listerman I, Sun J, Gazzaniga FS, Lukas JL, Blackburn EH. The major reverse transcriptase-incompetent splice variant of the human telomerase protein inhibits telomerase activity but protects from apoptosis. *Cancer Res.* 2013;73(9):2817-2828. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3082.
 172. Smith LL, Collier HA, Roberts JM. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat Cell Biol.* 2003;5(5):474-479. doi:10.1038/ncb985.
 173. Mokbel K, Parris CN, Ghilchik M, Williams G, Newbold RF. The association between telomerase, histopathological parameters, and KI67 expression in breast cancer. *Am J Surg.* 1999;178(1):69-72.
 174. Bustreo S, Osella-Abate S, Cassoni P, et al. Optimal Ki67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;157(2):363-371. doi:10.1007/s10549-016-3817-9.
 175. Gnant M, Thomssen C, Harbeck N. St. Gallen/Vienna 2015: A Brief Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care (Basel).* 2015;10(2):124-130. doi:10.1159/000430488.
 176. Maisonneuve P, Disalvatore D, Rotmensz N, et al. Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res.* 2014;16(3):R65. doi:10.1186/bcr3679.
 177. Castelo-Branco P, Leao R, Lipman T, et al. A cancer specific hypermethylation signature of the TERT promoter predicts biochemical relapse in prostate cancer: a retrospective cohort study. *Oncotarget.* 2016;7(36):57726-57736. doi:10.18632/oncotarget.10639.
 178. Ocon Hernandez O, Fernandez Cabrera MF, Perez Vicente S, Davila Arias C, Exposito Hernandez J, Olea Serrano N. [Breast cancer survival after 10 years of follow up, in Granada and Almeria Spanish Provinces]. *Rev Esp Salud Publica.* 2010;84(6):705-715.
 179. Andre MR, Amaral S, Mayer A, Miranda A. Breast cancer patients survival and



- associated factors: reported outcomes from the Southern Cancer Registry in Portugal. *Acta Med Port.* 2014;27(3):325-330.
180. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist.* 2004;9(6):606-616. doi:10.1634/theoncologist.9-6-606.
 181. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(4):252-271. doi:10.3322/caac.21235.
 182. Shandiz FH, Shabahang H, Afzaljavan F, et al. Ki67 Frequency in Breast Cancers without Axillary Lymph Node Involvement and its Relation with Disease-free Survival. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(3):1347-1350.
 183. Acevedo F, Camus M, Vial C, et al. [Predictive value of conventional immuno-histochemical biomarkers in breast cancer]. *Rev Med Chil.* 2015;143(6):724-732. doi:10.4067/S0034-98872015000600005.
 184. Thangarajah F, Enninga I, Malter W, et al. A Retrospective Analysis of Ki67 Index and its Prognostic Significance in Over 800 Primary Breast Cancer Cases. *Anticancer Res.* 2017;37(4):1957-1964. doi:10.21873/anticancer.11536.
 185. Tashima R, Nishimura R, Osako T, et al. Evaluation of an Optimal Cut-Off Point for the Ki67 Index as a Prognostic Factor in Primary Breast Cancer: A Retrospective Study. *PLoS One.* 2015;10(7):e0119565. doi:10.1371/journal.pone.0119565.
 186. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast.* 2008;17(4):323-334. doi:10.1016/j.breast.2008.02.002.
 187. Acs B, Kulka J, Kovacs KA, et al. Comparison of 5 Ki67 antibodies regarding reproducibility and capacity to predict prognosis in breast cancer: does the antibody matter? *Hum Pathol.* 2017;65:31-40. doi:10.1016/j.humpath.2017.01.011.
 188. Wu Y, Li G, He D, et al. Telomerase reverse transcriptase methylation predicts lymph node metastasis and prognosis in patients with gastric cancer. *Onco Targets Ther.* 2016;9:279-286. doi:10.2147/OTT.S97899.
 189. Vinagre J, Almeida A, Populo H, et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun.* 2013;4:2185. doi:10.1038/ncomms3185.
 190. Wang X, Lopez-Beltran A, Osunkoya AO, et al. TERT promoter mutation status in sarcomatoid urothelial carcinomas of the upper urinary tract. *Future Oncol.* 2017;13(8):705-714. doi:10.2217/fon-2016-0414.
 191. Ma CX, Ellis MJ. The Cancer Genome Atlas: clinical applications for breast cancer. *Oncology (Williston Park).* 2013;27(12):1263-1269-1279.
 192. Lee E, Moon A. Identification of Biomarkers for Breast Cancer Using Databases. *J cancer Prev.* 2016;21(4):235-242. doi:10.15430/JCP.2016.21.4.235.
 193. Chang JT-H, Wang F, Chapin W, Huang RS. Identification of MicroRNAs as Breast Cancer Prognosis Markers through the Cancer Genome Atlas. *PLoS One.* 2016;11(12):e0168284. doi:10.1371/journal.pone.0168284.
 194. Li C-Y, Xiong D-D, Huang C-Q, et al. Clinical Value of miR-101-3p and Biological Analysis of its Prospective Targets in Breast Cancer: A Study Based on The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Bioinformatics. *Med Sci Monit.* 2017;23:1857-1871.
 195. Liu C, Chang H, Li X-H, et al. Network Meta-Analysis on the Effects of DNA



- Damage Response-Related Gene Mutations on Overall Survival of Breast Cancer Based on TCGA Database. *J Cell Biochem*. May 2017. doi:10.1002/jcb.26140.
196. Liu L, He J, Wei X, et al. MicroRNA-20a-mediated loss of autophagy contributes to breast tumorigenesis by promoting genomic damage and instability. *Oncogene*. June 2017. doi:10.1038/onc.2017.193.
 197. Jang B-S, Kim IA. A radiosensitivity gene signature and PD-L1 status predict clinical outcome of patients with invasive breast carcinoma in The Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset. *Radiother Oncol*. June 2017. doi:10.1016/j.radonc.2017.05.009.
 198. Zhang L, Yan D-L, Yang F, et al. DNA methylation mediated silencing of microRNA-874 is a promising diagnosis and prognostic marker in breast cancer. *Oncotarget*. May 2017. doi:10.18632/oncotarget.17569.
 199. Kulic A, Plavetic ND, Gamulin S, Jakic-Razumovic J, Vrbancic D, Sirotkovic-Skerlev M. Telomerase activity in breast cancer patients: association with poor prognosis and more aggressive phenotype. *Med Oncol*. 2016;33(3):23. doi:10.1007/s12032-016-0736-x.
 200. Divella R, Tommasi S, Lacalamita R, et al. Circulating hTERT DNA in early breast cancer. *Anticancer Res*. 2009;29(7):2845-2849.
 201. Kirkpatrick KL, Clark G, Ghilchik M, Newbold RF, Mokbel K. hTERT mRNA expression correlates with telomerase activity in human breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2003;29(4):321-326.
 202. Bieche I, Nogues C, Paradis V, et al. Quantitation of hTERT gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res*. 2000;6(2):452-459.
 203. Widschwendter A, Muller HM, Hubalek MM, et al. Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase in ovarian and cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2004;93(2):407-416. doi:10.1016/j.ygyno.2004.01.036.
 204. Bell RJA, Rube HT, Kreig A, et al. Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science*. 2015;348(6238):1036-1039. doi:10.1126/science.aab0015.
 205. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*. 2013;339(6122):959-961. doi:10.1126/science.1230062.
 206. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(15):6021-6026. doi:10.1073/pnas.1303607110.
 207. Ceja-Rangel HA, Sanchez-Suarez P, Castellanos-Juarez E, et al. Shorter telomeres and high telomerase activity correlate with a highly aggressive phenotype in breast cancer cell lines. *Tumour Biol*. 2016;37(9):11917-11926. doi:10.1007/s13277-016-5045-7.
 208. Hoos A, Hepp HH, Kaul S, Ahlert T, Bastert G, Wallwiener D. Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. *Int J cancer*. 1998;79(1):8-12.
 209. Mokbel K, Parris CN, Radbourne R, Ghilchik M, Newbold RF. Telomerase activity and prognosis in breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 1999;25(3):269-272.
 210. Salhab M, Jiang WG, Newbold RF, Mokbel K. The expression of gene transcripts of telomere-associated genes in human breast cancer: correlation with



- clinico-pathological parameters and clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;109(1):35-46. doi:10.1007/s10549-007-9622-8.
211. Shen J, Gammon MD, Terry MB, et al. Genetic polymorphisms in telomere pathway genes, telomere length, and breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;134(1):393-400. doi:10.1007/s10549-012-2058-9.
 212. Gonzalez-Campora R, Davalos-Casanova G, Beato-Moreno A, et al. Apoptotic and proliferation indexes in primary superficial bladder tumors. *Cancer Lett.* 2006;242(2):266-272. doi:10.1016/j.canlet.2005.11.006.
 213. Gay-Bellile M, Romero P, Cayre A, et al. ERCC1 and telomere status in breast tumours treated with neoadjuvant chemotherapy and their association with patient prognosis. *J Pathol Clin Res.* 2016;2(4):234-246. doi:10.1002/cjp2.52.
 214. Chen C-H, Chen R-J. Prevalence of telomerase activity in human cancer. *J Formos Med Assoc.* 2011;110(5):275-289. doi:10.1016/S0929-6646(11)60043-0.